

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA – FAMED  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

**ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA E INTEROBSERVADOR  
E EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DOS  
GENES DE REPARO DO DNA NOS PÓLIPOS SERRILHADOS  
DOS HEMICÓLONS DIREITO E ESQUERDO.**

JULIANA ARAUJO CASTANHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, Brasil

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA – FAMED  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E  
HEPATOLOGIA

**ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA E INTEROBSERVADOR E  
EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DOS  
GENES DE REPARO DO DNA NOS PÓLIPOS SERRILHADOS DOS  
HEMICÓLONS DIREITO E ESQUERDO.**

JULIANA ARAUJO CASTANHO

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luíse Meurer**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção de título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

Araujo Castanho, Juliana  
ESTUDO DE VARIABILIDADE INTRA E INTEROBSERVADOR E  
EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS DOS GENES  
DE REPARO DO DNA NOS PÓLIPOS SERRILHADOS DOS  
HEMICÓLONS DIREITO E ESQUERDO. / Juliana Araujo  
Castanho. -- 2014.  
101 f.

Orientadora: Meurer Luise.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e  
Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Pólipos hiperplásicos. 2. Pólipos sésseis  
serrilhados. 3. Concordância diagnóstica. I. Luise,  
Meurer, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Ademir e Iolanda, que sempre apoiaram as minhas decisões e me estimularam a me inserir no meio acadêmico, e à minha querida Olga, minha eterna saudade.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Dra. Luíse Meurer que me abriu as portas para a pós-graduação e me orientou nesta árdua etapa. Sou muito grata por ter me dado a oportunidade de enfrentar tantos desafios e pela confiança que depositou em mim.

Ainda quero agradecer a Luíse e também ao Dr. Antônio Carlos Pütten, como proprietários do Laboratório Medicina Digital, pela compreensão nos momentos de ausência e por me disponibilizarem o tempo e o material necessários para que eu pudesse terminar esta pós-graduação.

À Raquel Rivero, minha amiga e tão valiosa colaboradora, obrigada por toda a ajuda e apoio.

À Flavinha do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA que foi sempre tão gentil e solícita.

Às minhas queridas Liane Golbspan e Francine Hehn de Oliveira, profissionais incansáveis, amigas extraordinárias, que me inspiram a sempre continuar.

À minha família pela paciência e incentivo.

E ao Rafael, meu amor, que ficou ao meu lado durante todo este processo.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.0 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>3.0 PERGUNTA DE PESQUISA.....</b>	<b>36</b>
<b>4.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5.0 HIPÓTESE.....</b>	<b>41</b>
<b>6.0 METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....</b>	<b>43</b>
<b>6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....</b>	<b>45</b>
<b>6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>48</b>
<b>6.6 FLUXOGRAMA.....</b>	<b>49</b>
<b>7.0 ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>51</b>
<b>8.0 RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>9.0 DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>10.0 CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>11.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>
<b>12.0 ARTIGO ORIGINAL.....</b>	<b>73</b>

<b>13.0 APÊNDICES .....</b>	<b>89</b>
-----------------------------	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

AS	Adenomas serrilhados tradicionais
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
CIMP	<i>CpG island methylation phenotype</i>
CpG	Cytosina-phosphodiester-Guanina.
GCHP	<i>Globet cell-rich type hyperplastic polyps</i>
HCPA -	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
KRAS-	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAPK -	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MLH1 -	<i>mutL homolog 1 [Homo sapiens (human)]</i>
mm-	milímetros
MMR -	<i>MisMatch Repair</i>
MPHP -	<i>Mucin poor type hyperplastic polyps</i>
MSH2 -	<i>mutS homolog 2 [Homo sapiens (human)]</i>
MSH6 -	<i>mutS homologue 6 [Homo sapiens (human)]</i>
MSI	<i>Microsatellites instability</i>
MVHP	<i>Microvesicular type hyperplastic polyps</i>
p16INK4a	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
PH	Pólipos hiperplásicos
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2(S. cerevisiae)[Homo sapiens (human)]</i>
PSS	Pólipos sésseis serrilhados
SMAD2	<i>Mothers Against DPP Homolog 2</i>



SMAD4      *Mothers Against DPP Homolog 4*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Estudos que avaliaram a concordância diagnóstica entre patologistas entre pólipos hiperplásicos (PH) e pólipos sésseis serrilhados (PSS) demonstraram uma grande variabilidade interobservador mesmo entre especialistas em patologia gastrointestinal. O protocolo de acompanhamento dos PSS não é modificado conforme a localização da lesão e isto pode ser determinado por eventuais diferenças na expressão das proteínas MLH1 e MSH2.

**OBJETIVOS:** Identificar diferenças na concordância diagnóstica que podem reforçar a necessidade de estratégias específicas para melhorar a uniformidade dos diagnósticos. Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas MLH1 e MSH2 entre lesões dos hemicólons direito e esquerdo.

**MÉTODOS:** Foram revisados 132 exames anatomopatológicos com diagnóstico de pólipo sésseis serrilhado ou pólipo hiperplásico por dois patologistas com ênfase em gastroenterologia e um terceiro sem ênfase em gastroenterologia. Foram realizados exames imuno-histoquímicos para avaliação da expressão das proteínas MLH1 e MSH2 em 108 lesões.

**RESULTADOS:** Foram realizadas duas avaliações por um dos patologistas com ênfase em gastroenterologia para determinar a concordância intraobservador. Dos 64 PH, 2 (3,1%) foram reclassificadas como mucosa colônica normal e 4 (6,2%) foram rediagnosticados como PSS. Das 60 lesões inicialmente diagnosticadas como PSS, 1 (1,7%) foi reclassificada como PH. O teste de Kappa para concordância resultou no valor de 0,89. Os 117 pólipos que apresentaram concordância foram revisados pelo segundo patologista com ênfase em gastroenterologia. Dos 58 PH, 1 (1,7 %) foi readiagnosticado como mucosa colônica normal e 4 (6,9%), foram readiagnosticados como PSS. Dos 59 PSS, 4 (6,8%) foram rediagnosticadas como PH pelo segundo patologista. A variabilidade interobservador resultou em um valor de Kappa de 0,85. Os 108 pólipos que apresentaram concordância nas avaliações anteriores foram também analisados por um terceiro patologista sem ênfase em gastroenterologia. Dos 55 PSS, 25 (45,4%) foram diagnosticadas como PH pelo patologista geral. Todos os PH diagnosticados

pelo patologista geral foram diagnosticados como pólipos hiperplásicos pelos dois primeiros patologistas. O valor do teste Kappa para concordância entre os três patologistas foi de 0,54. O estudo imuno-histoquímico mostrou-se positivo em todas as lesões tanto para expressão da proteína MLH1 quanto para MSH2.

**CONCLUSÃO:** O valor de Kappa encontrado de 0,89 para concordância intraobservador e 0,85 para interobservador entre os patologistas com ênfase em gastroenterologia mostra uma concordância classificada como alta. O valor de Kappa de 0,55 resultante da comparação entre os patologistas com e sem interesse especial em gastroenterologia, mostra uma concordância moderada. É importante considerar que nenhum pólipo hiperplásico diagnosticado pelo patologista geral recebeu o diagnóstico de pólipo séssil serrilhado nas avaliações anteriores. Com isso, podemos observar que a dificuldade diagnóstica está relacionada estritamente aos PSS e isso pode ser explicado pela subjetividade no diagnóstico destas lesões.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Studies of interobserver agreement among pathologists for the diagnosis of hyperplastic polyps (HPPs) and sessile serrated polyps (SSPs) have demonstrated substantial interobserver variability, even amidst experts in gastrointestinal pathology. There is no difference in the SSP follow-up protocol according to its location however it may change as a consequence of MLH1 and MSH2 protein expression variation. **OBJECTIVES:** To identify differences in diagnostic concordance that could justify specific strategies to improve diagnostic uniformity. To study the immunohistochemical analysis for the expression of MLH1 and MSH2 proteins in the right and left hemicolons. **METHODS:** One hundred twenty-four anatomic pathology specimens with a diagnosis of SSP or HPP were examined by two pathologists with a special interest in gastroenterology (specialists) and one general pathologist. Immunohistochemical analysis for the expression of MLH1 and MSH2 protein was conducted in 108 lesions. **RESULTS:** Two assessments were conducted by one of the specialist pathologists to determine intraobserver agreement. Of the 64 HPP specimens, 2 of the entire sample (3.1%) were reclassified as normal colonic mucosa and 4 (6.2%) were reassessed as SSPs. Of the 60 lesions initially diagnosed as SSPs, 1 (1.7%) was reclassified as HPPs. The kappa statistic for agreement was 0.89. The 117 specimens in which there were no diagnostic disagreements were then reassessed by the second specialist pathologist. Of 58 HPPs, 1 (1.7%) was reclassified as normal colonic mucosa and 4 (6.9%) were reclassified as SSPs. Of 59 the SSPs, 4 (6.8%) were reclassified as HPPs by the second pathologist. This interobserver variability yielded a kappa value of 0.85. Finally, the 108 specimens in which there were no diagnostic disagreements in the preceding assessments were reviewed by a third pathologist with no special interest in gastroenterology. Of 55 SSPs, 25 (45.4%) were diagnosed as HPPs by the general pathologist. All HPPs diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as such by the two specialist

pathologists. The kappa value for agreement among the three pathologists was 0.54. The immunohistochemical analysis was positive for both MLH1 and MSH2 protein in all the lesions studied. **CONCLUSION:** The kappa values of 0.89 for intraobserver agreement and 0.85 for interobserver agreement between the gastrointestinal pathologists are indicative of substantial agreement. The kappa value of 0.55 for comparison among pathologists with and without a special interest in gastroenterology indicates moderate agreement. It is worth noting that no hyperplastic polyps diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as sessile serrated adenoma on previous assessments. Therefore, we conclude that diagnostic difficulty is strictly associated with SSPs, which may be explained by the subjective nature of diagnosis of these lesions.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. AS.....</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 2. MVHP.....</b>	<b>22</b>
<b>FIGURA 3. MVHP.....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 4. GCHP E MPHP.....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 5. PSS.....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURA 6. PSS.....</b>	<b>27</b>
<b>FIGURA 7. COMPARAÇÃO ENTRE AS SUPERFÍCIES DOS PH E PSS.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 8. COMPARAÇÃO ENTRE AS BASES DOS PH E PSS.....</b>	<b>28</b>
<b>FIGURA 9. PSS COM DISPLASIA.....</b>	<b>31</b>
<b>FIGURA 10. EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS MLH1 E MSH2.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DE KUDO E TSURUTA.....</b>	<b>25</b>
<b>TABELA 2: PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DOS PSS.....</b>	<b>26</b>

# **1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA**

## 1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A hipótese de que o acúmulo de mutações genéticas levará um epitélio normal à neoplasia invasora, como escrito por Vogelstein na clássica evolução das lesões colônicas, é hoje aceita como um princípio geral da carcinogênese <sup>1</sup>.

Duas vias genéticas são atualmente responsáveis pelo desenvolvimento do adenocarcinoma do cólon: a via APC/ $\beta$ -catenina e a via serrilhada. O desenvolvimento do adenocarcinoma colônico inicia com a presença de lesões polipoides benignas na mucosa que possuem potencial de progressão. Estas lesões polipoides são atualmente divididas em adenomas clássicos e lesões serrilhadas do cólon e estão associadas a vias moleculares distintas de progressão para adenocarcinoma <sup>2</sup>.

A via APC está associada à sequência adenoma-carcinoma clássica tendo como início a presença de adenomas convencionais na mucosa colônica e é responsável por até 80% dos tumores colônicos esporádicos. A proteína APC se liga a  $\beta$ -catenina e promove a sua degradação. A mutação neste gene é um evento inicial nesta via e, após a inativação de ambas as suas cópias, a proteína perde a sua função. A  $\beta$ -catenina, então, acumula-se e promove a transcrição de genes que promovem a proliferação celular. Somando-se a este evento, mutações adicionais em genes supressores tumorais como *KRAS*, *SMAD2* e *SMAD4* também promovem crescimento celular e inibem a apoptose. Destes genes adicionais o mais importante nesta via é o *KRAS*. A mutação no *KRAS* é considerada um evento tardio na sequência adenoma-carcinoma e estima-se que ela está presente em 10% dos adenomas menores do que 1,0 cm e em 50% dos adenocarcinomas. Também tardiamente nesta via, encontra-se a mutação no gene supressor tumoral p53. Este gene está mutado em 70% a 80% dos adenocarcinomas do cólon. A presença de mutações em múltiplos genes responsáveis



pelo controle do crescimento celular, gerando uma instabilidade cromossômica é a principal característica desta via <sup>2</sup>.

O termo “via serrilhada” de carcinogênese colorretal foi criado por Jass e colaboradores e é aplicado principalmente para os pólipos sésseis serrilhados (PSS) que fazem parte do grupo de lesões serrilhadas do cólon <sup>3, 4</sup>. A patogênese do carcinoma colorretal por esse caminho envolve três eventos distintos: a instabilidade cromossômica, a metilação de múltiplas ilhas de *CpG* (*CIMP*) e a instabilidade de microssatélites <sup>5</sup>. O acúmulo progressivo dessas alterações genéticas e epigenéticas leva a transformação do epitélio colônico normal em adenocarcinoma do cólon <sup>6</sup>.

A primeira alteração que ocorre nas lesões associadas à via serrilhada é a instabilidade cromossômica, que é caracterizada pela presença de mutação no gene *BRAF*. Cerca de 80% dessas mutações são uma transversão de T para A no nucleotídeo 1796, convertendo uma valina no aminoácido 600 e em um ácido glutâmico (V600E). Um único ponto de ativação do gene *BRAF* resulta em sinalização da via da proteína *MAPK*, resultando em proliferação celular e inibição da apoptose. A ativação de produtos dos oncogenes como *BRAF* usualmente induz a proliferação seguida por senescência celular. Este processo depende da cooperação de supressores tumorais, como p16INK4a e p53 para parar o ciclo celular. Supressão desses genes reguladores do ciclo produz desvio do estado senescente e proliferação celular descontrolada que progride para carcinoma. Supressão do p16INK4a induzido por metilação é um achado comum na via serrilhada <sup>7</sup>.

Tem sido proposto que a suscetibilidade para neoplasias serrilhadas está associada com predisposição genética a hipermetilação de genes promotores <sup>8</sup>. O DNA é metilado pela ação da DNA metiltransferase em adicionar de um grupo metil para uma base citosina. Densos grupos de dinucleotídeos citosinas seguidos por guanina (*CpG*), chamados de ilhas de *CpG*, são encontrados nas regiões promotoras de aproximadamente metade de todos os genes

<sup>7</sup>. Hipermetilação aberrante das citosinas das ilhas *CpG* das regiões promotoras dos genes funcionantes, tem sido associada com inativação dos genes supressores tumorais, inclusive do *MLH1*, levando ao câncer <sup>9</sup>. Dois tipos de eventos de metilação são reconhecidos: tipo A, que é o acúmulo de metilação que ocorre com o envelhecimento e tipo C que é mais específica para o processo de carcinogênese. Cerca de 18% de todos os carcinomas colorretais apresentam hipermetilação do tipo C, e estes são chamados tumores com fenótipo metilador das ilhas *CpG*, um fenômeno chamado de *CIMP*. Embora a maioria dos tumores esporádicos associados à instabilidade de microssatélites tem *CIMP*, isto não é limitado a este tipo de tumor e aproximadamente metade de todos os tumores com *CIMP* não tem metilação na região promotora do gene *MLH1* ou instabilidade de microssatélites <sup>7</sup>.

Estudos mostram que 15 a 20% dos carcinomas colorretais esporádicos apresentam instabilidade de microssatélites e estes são predominantemente localizados no cólon proximal <sup>6,10, 11, 12</sup>. As regiões de microssatélites são sequências de repetições de 1-5 nucleotídeos, presentes entre 50.000 a 100.000 no genoma humano e altamente suscetíveis a erro de emparelhamento durante a replicação do DNA. Nessas regiões onde ocorrem sequências de base altamente repetidas, a DNA polimerase pode “escorregar” pelo DNA molde, promovendo exclusão ou inserção de trechos inteiros na fita nova. Caso o erro persista, a molécula de DNA recém-sintetizada apresentará uma base ou um trecho de alguns nucleotídeos erroneamente emparelhados (*mismatch*). Um mecanismo específico de reparo do DNA por excisão é então mobilizado para corrigir a região do DNA contendo o mau emparelhamento: o reparo de emparelhamento errôneo (*MMR, MisMatch Repair*) <sup>9</sup>. Quando os genes do *MMR* não estão ativos, o mau alinhamento não é corrigido e o tamanho das sequências de DNA repetitivo é diferente entre as fitas. Células deficientes no mecanismo de *MMR* apresentam como fenótipo uma alta frequência espontânea de mutações e propensão para desenvolver adenocarcinoma <sup>9,13, 14</sup>. No tumor com *MMR* eficiente, o número de

repetições na região de microssatélite é o mesmo no tecido tumoral e normal pareados, e é chamado tumor com microssatélite estável <sup>14</sup>. Já no tumor com microssatélite instável, os erros no número de repetições ocorrem com as células mais proliferativas, o que resulta em células tumorais com número de repetições diferentes do que o tecido normal na região de microssatélite <sup>9</sup>. O sistema *MMR*, responsável por manter a fidelidade replicativa do DNA, é composto pelos genes de reparo do emparelhamento do DNA humanos: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2* <sup>2</sup>. Estes genes são também chamados genes mutadores e agem como controladores de qualidade, mantendo a fidelidade do DNA na divisão celular, por meio de mecanismos que identificam, retiram e corrigem os erros na sequências de bases <sup>2</sup>. Estudos iniciais com bactérias *Escherichia coli* e fungos *Saccharomyces cerevisiae* descreveram a presença de proteínas L e proteínas S mutadas associadas à instabilidade de microssatélites (*MSI*) e estas proteínas receberam o nome de *mutS* e *mutL*. Derivadas dos nomes das proteínas em bactérias e leveduras, as proteínas humanas foram chamadas de *hMutS* e *hMutL* e os genes que constituem o sistema de reparo do emparelhamento do DNA humanos foram chamados *hMLH1* (*mutL homolog 1 [Homo sapiens (human)]; gene humano mutL homólogo*), *hMSH2* e *hMSH6* (*mutS homolog 2 and 6 [Homo sapiens (human)]; genes humanos mutS homólogos 2 e 6*), e *hPMS2* (*postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)[Homo sapiens (human)]; gene humano do aumento da segregação pós-meiótica 2*) <sup>6</sup>. A maioria das alterações ocorre nos genes *MLH1* e *MSH2*, sendo a hipermetilação da região promotora do gene *MLH1* a maior causa de instabilidade de microssatélites em câncer esporádico <sup>7</sup>. Pacientes com alterações herdadas nos genes de reparo apresentam uma mutação germinativa de um alelo do gene e um alelo normal que, após uma segunda mutação somática, é inativado. Algumas sequências de microssatélites estão localizadas na região promotora ou codificadora dos genes envolvidos no crescimento celular que, com a perda de reparo do emparelhamento, perdem

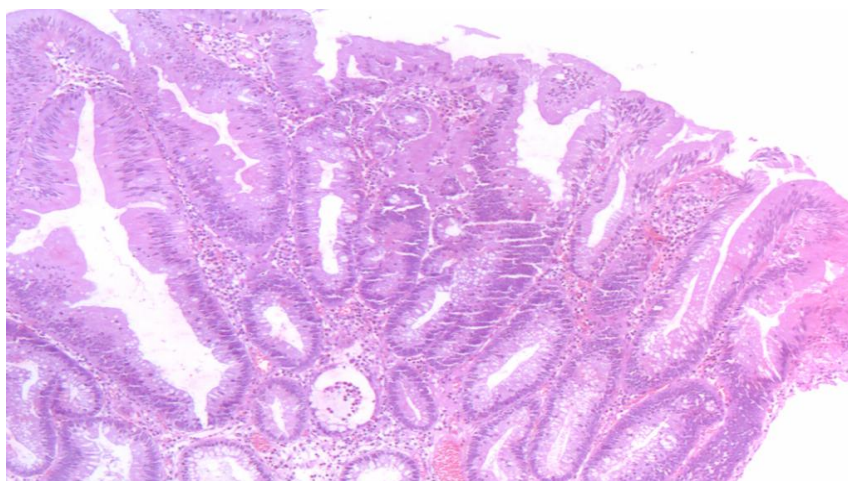
sua atividade de controle do ciclo celular, inibindo a apoptose e levando ao surgimento dos carcinomas colorretais <sup>2</sup>.

Pólipos colônicos, definidos como protrusões no lúmen intestinal, podem ocorrer em qualquer sítio dos cólons e reto, podem variar amplamente de tamanho e possuem uma gama de diagnósticos histológicos. A maior preocupação relacionada aos pólipos epiteliais é seu potencial de progressão para carcinoma, uma associação muito bem documentada para os pólipos diagnosticados como adenomas convencionais. Classicamente, os pólipos epiteliais frutos de excesso de proliferação são divididos em neoplásicos e não neoplásicos <sup>2</sup>.

As lesões serrilhadas do cólon e reto são proliferações da mucosa e dividem-se em adenomas serrilhados tradicionais (AS), pólipos hiperplásicos (PH), e pólipos sésseis serrilhados (PSS). Muitos estudos mostram a importância do diagnóstico diferencial entre estas, já que possuem prognósticos diferentes. PH são lesões não neoplásicas e não apresentam progressão para carcinoma. AS e PSS são neoplásicos e apresentam progressão para carcinoma colorretal, os primeiros pela associação com hipermetilação de genes e os PSS são precursores de carcinomas colorretais com instabilidade de microssatélites <sup>13</sup>.

O adenoma serrilhado tradicional, lesão descrita em 1990 por Longcrace e Fenoglio-Preiser, mostra características intermediárias entre PH e adenomas convencionais <sup>7, 15</sup>. Cerca de 0,6 % de todos os pólipos colorretais são AS e são mais comuns no cólon esquerdo <sup>3,16</sup>. São lesões assintomáticas e ao exame endoscópico são avermelhadas e protuberantes, lembrando os adenomas convencionais. Histologicamente, apresentam uma arquitetura viliforme, com áreas de serrilhamento das criptas que são mais proeminentes na superfície da lesão (Figura 1). Porém, diferente das demais lesões serrilhadas, mostram células alteradas, com achados de displasia convencional, como presença de estratificação nuclear e mitoses, que na maioria das outras lesões serrilhadas são esparsas. As células são colunares altas, com

citoplasma eosinofílico e núcleos alongados, hipercromáticos, centralmente localizados, principalmente na base da lesão <sup>13, 17</sup>.

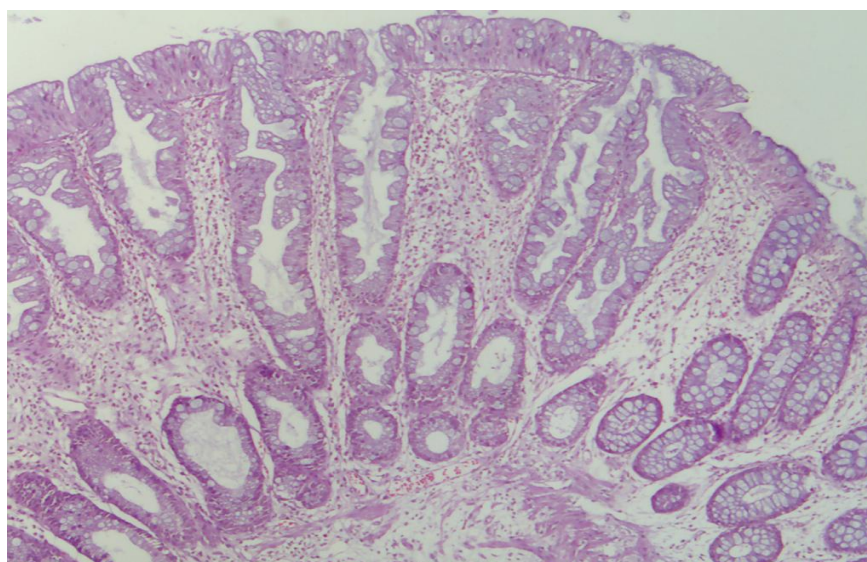


**FIGURA 1. Adenoma serrilhado tradicional: áreas de serrilhamento associadas a displasia epitelial. HE 100x**

Os PH correspondem a mais de 75% das lesões serrilhadas do cólon. PH são mais comuns em homens em alguns, porém não em todos os estudos <sup>18</sup>. São predominantes no cólon distal e reto, sendo que 90% dessas lesões ocorrem no retossigmoide, onde podem ser múltiplas <sup>13</sup>. PH raramente causam sintomas. De acordo com sua histologia, os PH se dividem em três tipos, a ser: microvesicular (MVHP- *microvesicular hyperplastic polyps*), que é o tipo mais comum, apresentam distribuição ampla pelo cólon porém ainda com frequência maior no cólon esquerdo; rico em células caliciformes (GCHP- *Goblet cell-rich type hyperplastic polyps*), que são quase exclusivamente vistos no cólon esquerdo; e o tipo pobre em mucina (MPHP- *Mucin poor type hyperplastic polyps*), que é o menos comum <sup>13</sup>. Endoscopicamente, são lesões levemente elevadas, de coloração branco-perolada e com difícil visualização quando a luz intestinal está plenamente distendida. Na cromoendoscopia, o diagnóstico é facilitado pela identificação da abertura das criptas, que é maior do que nas criptas normais adjacentes, com orifícios de forma arredonda nos GCHP e estrelada nos MVHP <sup>13</sup>. PH apresentam diâmetro menor do que 5,0 mm em 1/3 dos casos, tendendo a ser

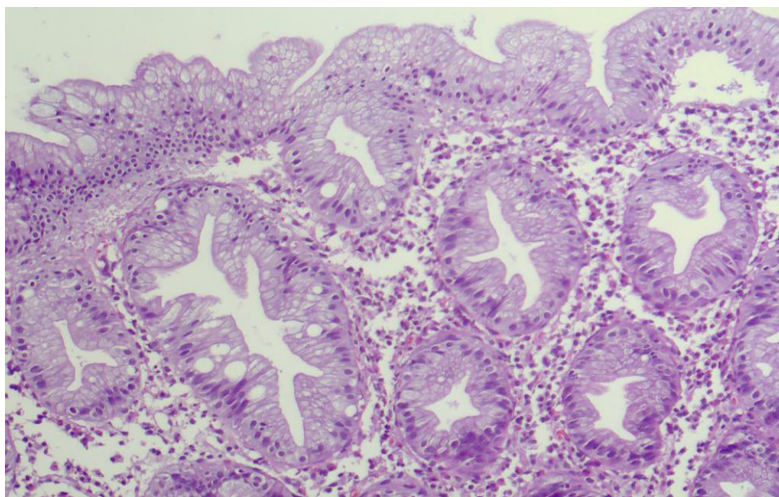
maiores no cólon direito. Todos os subtipos de PH são caracterizados por alongamento das criptas com variáveis graus de serrilhamento, mostrando células indiferenciadas na base da cripta, poucas mitoses e serrilhamento apenas no seu terço superior <sup>17</sup>.

MVHP são caracterizados pela presença de células epiteliais com mucina microvesicular com ou sem alternância de células caliciformes e tendem a mostrar serrilhamento proeminente (Figuras 2 e 3). Um estudo comparando a epidemiologia destas lesões entre pacientes ocidentais e orientais demonstrou que a prevalência é maior no cólon direito em pacientes orientais, ao contrário do que é descrito para pacientes ocidentais <sup>19</sup>. GCHP são lesões pequenas, geralmente medindo menos de 5,0 mm e são compostos por muitas células caliciformes com presença de serrilhamento discreto. Ambos os subtipos tem núcleos sem atipias. MPHP são raros, perfazendo 1 a 2% dos PH e não apresentam vesículas contendo mucina <sup>16, 18</sup>. Podem ter serrilhamento proeminente e se caracterizam pela presença de alterações nucleares de tipo reativo (Figura 4).

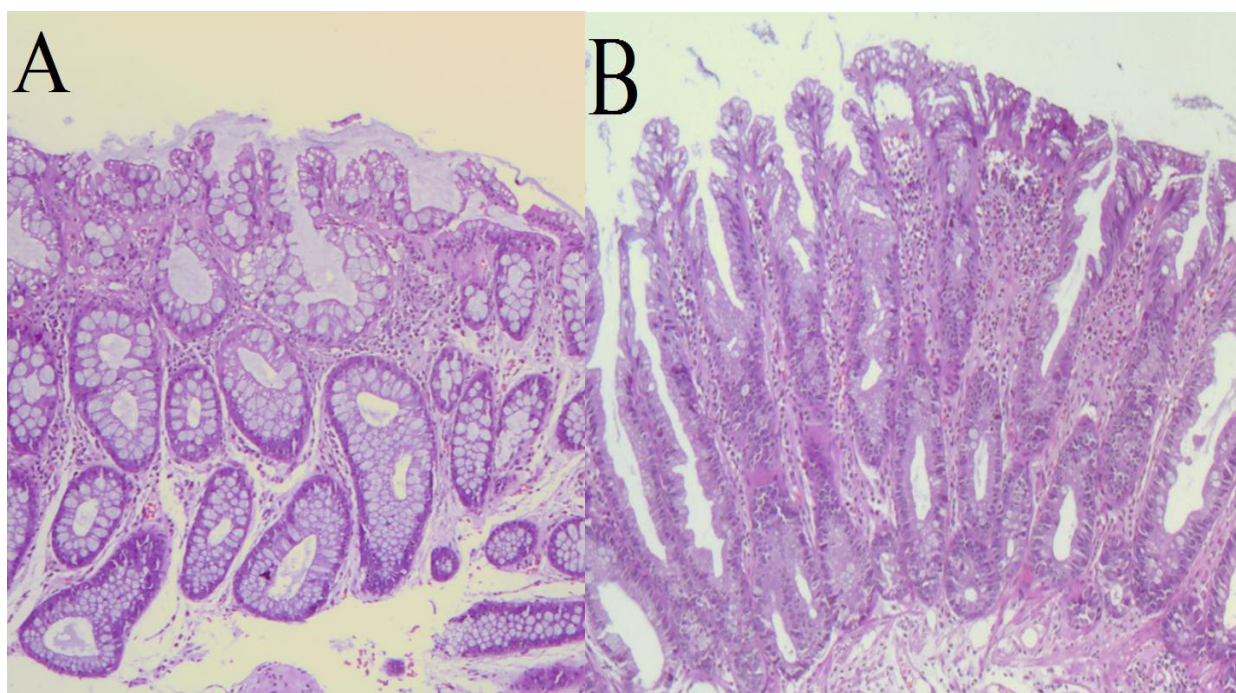


**FIGURA 2. Pólipo hiperplásico do tipo microvesicular. Serrilhamento importante no terço superior e diminuição do número de células caliciformes. HE 100x**





**FIGURA 3.** Pólipo hiperplásico microvesicular. Em maior aumento, observa-se a diminuição das células caliciformes e a presença de pequenas vesículas na superfície da lesão contendo mucina. HE 200x



**FIGURA 4.** A: Pólipo hiperplásico do tipo rico em células caliciformes apresentando discreto serrilhamento e grande número de células caliciformes. B: Pólipo hiperplásico do tipo pobre em mucina apresentando raras células caliciformes, serrilhamento importante e alterações epiteliais do tipo reativo. HE 100x.

Os PSS foram originalmente descritos por Torlakovic em 2003, inicialmente com o termo adenoma séssil serrilhado, apesar de não demonstrarem critérios de displasia convencional <sup>20</sup>. A classificação da Organização Mundial da Saúde recomenda o uso

combinado das duas nomenclaturas (pólipo sésil serrilhado/ adenoma sésil serrilhado) para o diagnóstico dessas lesões. Os PSS correspondem a cerca de 9% dos pólipos colônicos e acredita-se que 15 a 20% das lesões anteriormente diagnosticadas como PH seriam hoje reclassificadas como PSS<sup>16, 21</sup>. Em pacientes ocidentais, PSS apresentam maior prevalência no gênero feminino, oposto ao que é descrito nos pacientes orientais, onde a prevalência é maior no gênero masculino. Acredita-se que a dieta e o estilo de vida possam contribuir para as diferenças encontradas entre as duas populações<sup>19, 22, 23</sup>.

PSS são lesões assintomáticas e ocorrem mais frequentemente no cólon direito, porém não são restritos a essa localização<sup>24, 25</sup>. Geralmente medem mais de 5,0 mm de diâmetro, sendo que 15 a 20% atingem mais de 10,0 mm de diâmetro<sup>13, 17</sup>. No exame colonoscópico, têm coloração amarelada pelo depósito de muco intestinal na superfície da lesão, com presença de orifícios glandulares dilatados causados pelo depósito de muco dentro das criptas e se apresentam como elevações sésseis da mucosa, muitas vezes discretas, podendo ser mal interpretadas como alargamento focal das pregas<sup>13, 16, 26, 27</sup>. Existem raras descrições de PSS pediculados<sup>28</sup>. Na tentativa de se estabelecer alterações colonoscópica que sejam mais específicas dos PSS, duas características foram descritas na literatura: a interrupção do padrão vascular mucoso normal pela diminuição da vascularização na superfície destes pólipos e a presença de um padrão de abertura das criptas, derivado da classificação de Kudo, classificado como *II-open* ou *II-o*. Este padrão é similar ao tipo II, porém apresenta uma mistura de criptas amplas mostrando aberturas mais arredondadas causadas pelo depósito de mucina no interior das criptas dilatadas e criptas pequenas com formas estreladas<sup>10, 29</sup>.



Tabela 1. Classificação de Kudo e Tsuruta	
Tipo I	Criptas regulares e redondas
Tipo II	Criptas papilares ou estreladas
Tipo III <sub>S</sub>	Criptas pequenas tubulares ou arredondadas, menores do que o normal
Tipo III <sub>L</sub>	Criptas grandes tubulares ou arredondadas, maiores do que o normal
Tipo IV	Criptas transversais
Tipo V <sub>1</sub>	Criptas irregulares
Tipo V <sub>N</sub>	Criptas desestruturadas, perda ou diminuição das criptas

Adaptado de: Kudo e colaboradores<sup>30</sup>. Hasegawa e colaboradores<sup>31</sup>.

O rastreamento colonoscópico tem se mostrado menos efetivo em diminuir a incidência e mortalidade dos carcinomas do cólon direito quando comparado com o cólon distal. Acredita-se que a causa seja a dificuldade em se detectar e remover acuradamente os PSS<sup>32</sup>. Na tentativa de estabelecer critérios endoscópicos que os diferenciariam, Nakao e colaboradores concluíram que os achados mais significativos são o tamanho da lesão, já que PSS tendem a se apresentar como lesões maiores de 1,0 cm, a presença da capa de mucina recobrimdo os PSS e o padrão mais dilatado dos orifícios glandulares nestas lesões<sup>28,31</sup>.

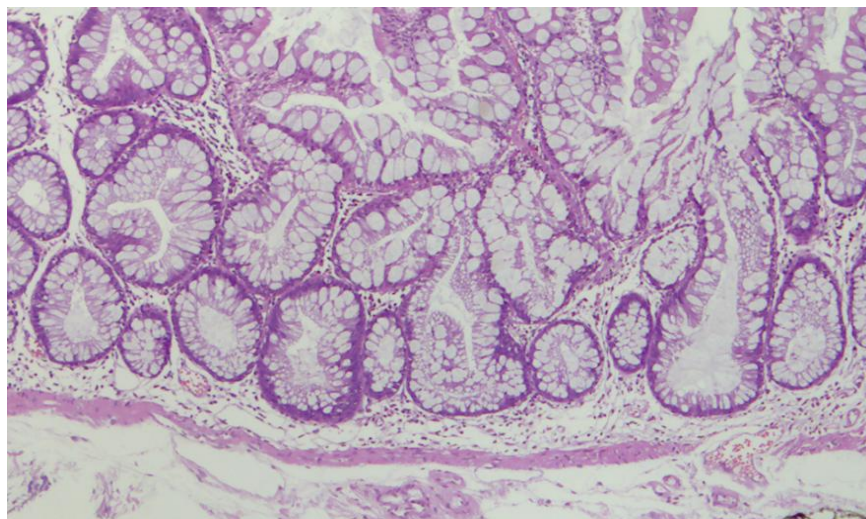
A taxa de detecção endoscópica tem variado de 1 a 18% e os PSS apresentam altos índices de excisão incompleta. Estudos sugerem que PSS do cólon direito com ou sem displasia predizem a presença de lesões com displasia em um período de 5 anos, e por isso o acompanhamento endoscópico deveria ter um intervalo mais curto do que o preconizado para os adenomas<sup>23</sup>. Atualmente os protocolos de acompanhamento sugerem que pacientes com pólipos sem displasia menores do que 10,0 mm devem ser submetidos a exames colonoscópicos em intervalo de 5 anos. Pacientes com pólipos maiores do que 10mm ou com displasia devem ser submetidos a exame em intervalos de três anos e ressecções *piecemeal*

devem ser seguidas de exame endoscópico em 3-6 meses para avaliar a presença de pólipos residuais ou recorrentes <sup>10, 33, 34</sup>.

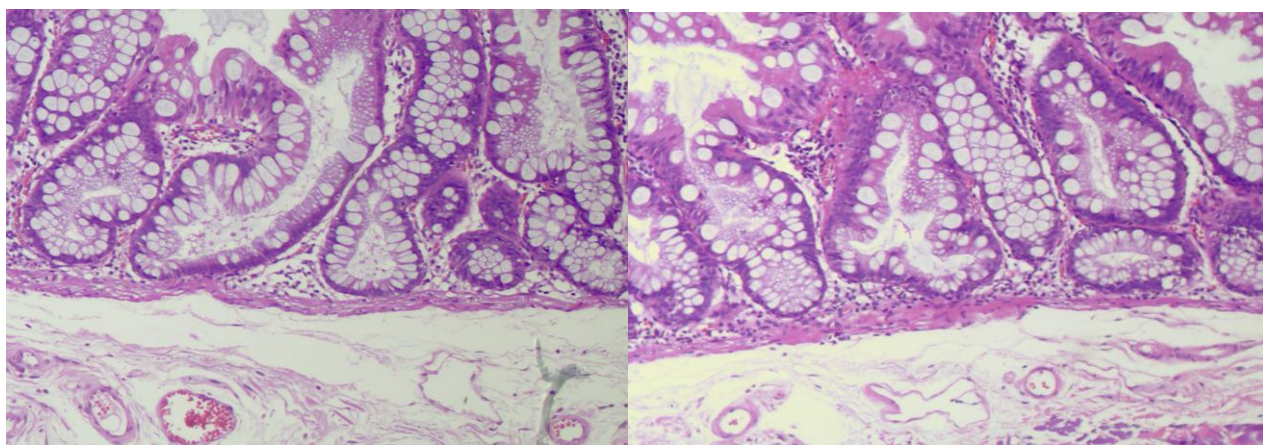
<b>Tabela 2. PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO DOS PSS</b>				
<b>Histologia</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Número</b>	<b>Localização</b>	<b>Intervalo</b>
<b>PSS</b>	< 10mm	< 3	Qualquer	5 anos
<b>PSS</b>	≥ 10mm	1	Qualquer	3 anos
<b>PSS</b>	< 10mm	≥ 3	Qualquer	3 anos
<b>PSS</b>	≥ 10 mm	≥ 2	Qualquer	1-3 anos
<b>PSS com displasia</b>	Qualquer	qualquer	Qualquer	1-3 anos

Adaptado de: *Rex e colaboradores*<sup>18</sup>.

Ao exame microscópico, os PSS são caracterizadas pela “displasia arquitetural” e mostram serrilhamento importante que se estende da base até a superfície do pólipo (Figura 5) <sup>13,17</sup>. As criptas têm aparência desorganizada, com dilatação da luz e presença de mucina no seu interior <sup>16</sup>. Algumas criptas mostram um crescimento paralelo à muscular da mucosa, criando criptas com a forma da letra L ou T invertida, que são achados característicos dessas lesões (Figura 6) <sup>17, 35, 36</sup>. Podem apresentar pseudoestratificação nuclear, irregularidades no contorno dos núcleos, presença de pequeno nucléolo proeminente e figuras mitóticas que são mais proeminentes na base, mas podem ocorrer no terço superior ou mesmo na superfície das criptas.



**FIGURA 5. Pólipo séssil serrilhado. Presença de serrilhamento importante desde a base da lesão e proeminente dilatação da base da cripta. HE 100x**



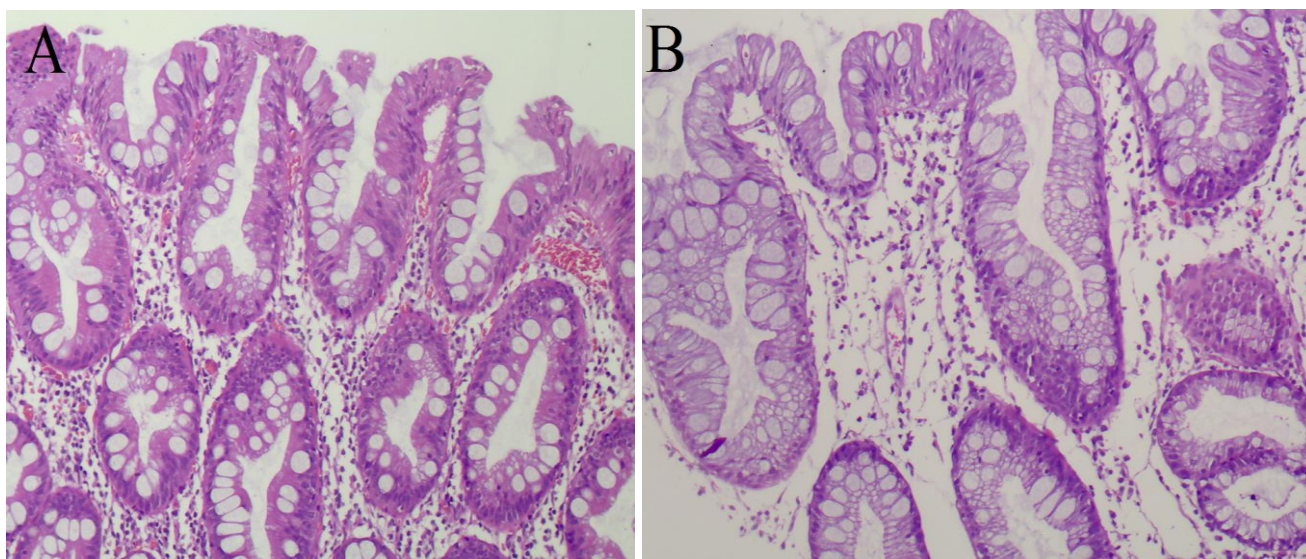
**FIGURA 6. Pólipo séssil serrilhado. Caracteristicamente as glândulas crescem paralelamente à camada muscular da mucosa formando figuras como as letras L e T invertida. HE 100x**

Em contraste com os PH, PSS mostram diferenciação celular na base da cripta, com presença de células calciformes ou foveolares gástricas. A proeminente dilatação da base da cripta nos PSS é o critério de diferenciação mais importante entre as duas lesões, razão pela qual biópsias superficiais ou mal incluídas dificultam o diagnóstico diferencial porque o epitélio de superfície é similar (Figuras 7 e 8) <sup>17</sup>. Essa dificuldade de diferenciação é mais pronunciada nas lesões localizadas no cólon direito com fragmentação da amostra, parcialmente excisadas ou menores do que 5,0 mm. Lesões com achados intermediários

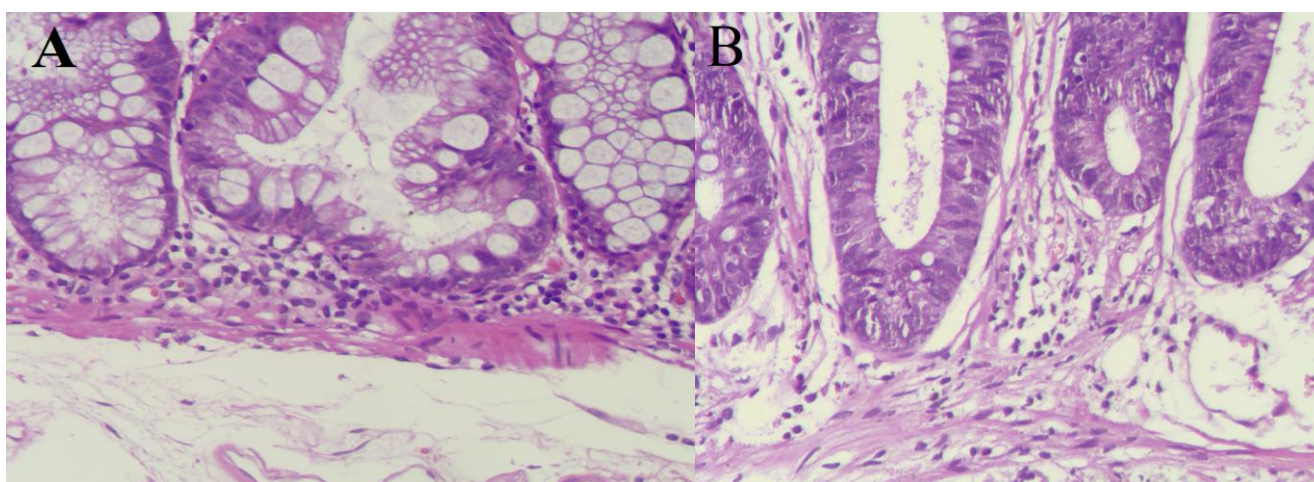


também são de difícil diagnóstico, principalmente quando há dilatação da base da cripta, com abundante mucina no lúmen, mas sem distorções arquiteturais ou serrilhamento importantes

13, 15, 17, 36



**FIGURA 7.** As imagens mostram o mesmo serrilhamento presente no epitélio superficial dos pólipos hiperplásicos (A) e dos pólipos sésseis serrilhados (B), não sendo possível fazer a distinção entre as lesões. HE 100x.



**FIGURA 8.** A: Base da cripta de um pólipo sésseis serrilhado mostrando dilatação e presença de células diferenciadas como as caliciformes. B: Base cripta de um pólipo hiperplásico mostrando ausência de dilatação e imaturidade celular.

Alguns autores tem sugerido a criação de uma categoria borderline entre os MVPH e os PSS para lesões em que pelo menos uma das seguintes alterações estruturais está

inequivocamente presente: dilatação da base da cripta, serrilhamento da base ou crescimento da cripta com orientação horizontal. Esta categoria seria também aplicada para lesões que apresentem duas áreas sugestivas destas alterações porém não inequívocas <sup>21, 37</sup>. A classificação da Organização Mundial de Saúde estabelece que, para o diagnóstico dos PSS, são necessários achados como alargamento de criptas, serrilhamento desde a base da cripta e presença de células diferenciadas na base presentes em pelo menos 3 criptas do total da lesão ou em duas criptas adjacentes, porém, em uma conferência para o consenso das lesões serrilhadas do cólon realizada em Cleveland em 2010, foi sugerido que a presença de apenas uma cripta com distorções arquiteturais inequívocas é suficiente para o diagnóstico dos PSS <sup>13, 18, 21</sup>. Estudos que avaliaram a concordância diagnóstica entre patologistas nas lesões serrilhadas do cólon, especialmente entre PH e PSS, demonstraram uma grande variabilidade interobservador mesmo entre especialistas em patologia gastrointestinal. Os resultados mostram que a concordância é no máximo moderada e não vem aumentando mesmo com a definição de critérios mínimos para o diagnóstico dos PSS <sup>7, 15, 18, 28, 36</sup>. No reto, o principal desafio diagnóstico é a presença de áreas de prolapso da mucosa que apresentam alterações como serrilhamento de criptas, espessamento da muscular da mucosa que se estende para a lâmina própria entre as criptas e presença de criptas dilatadas com formato de diamante associadas a inflamação crônica. Essas alterações causam uma distorção arquitetural na mucosa que pode ser confundida com achados de PSS <sup>38</sup>.

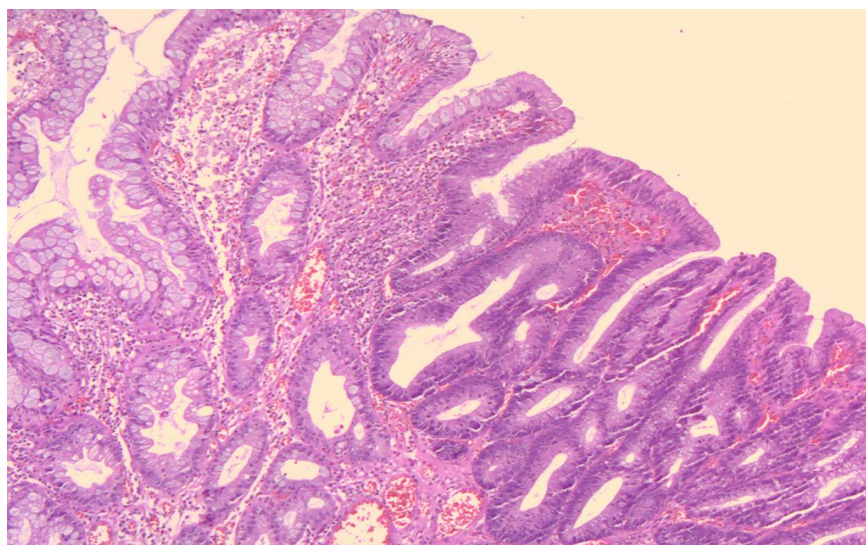
A progressão de PH para PSS ainda não está clara. Relatos na literatura mostram que algumas alterações moleculares associadas à via serrilhada apresentam expressão em PH. Mutação no gene BRAF ocorre em 67% dos pólipos hiperplásicos (PH) e em 81% dos PSS <sup>39</sup>. O gene BRAF está mutado na vasta maioria dos PSS e comumente no MVHP. A presença da mutação está associada à multiplicidade de pólipos e quase nunca está presente nos adenomas convencionais <sup>13, 40</sup>. CIMP ocorre em ordem de frequência em 47% dos MVPH, 75% dos PSS

e 80% dos AS. Estima-se que 75 a 83% dos PSS têm mutação no gene *BRAF* e apresentam altos níveis de CIMP<sup>7</sup>. Acredita-se que a expressão de marcadores e presença de mutações associadas à via serrilhada seja mais prevalente em PH, e particularmente em MVHP, localizados no cólon direito e que estes podem progredir para PSS e com isso serem suscetíveis à transformação maligna, mas a teoria ainda é controversa<sup>13, 19, 41-43</sup>.

Resultados de estudos sobre a metilação do gene *MLH1* são também controversos. Acredita-se que pólipos sésseis serrilhados sem displasia convencional geralmente não apresentam metilação da região promotora do gene *MLH1* e que a metilação seria um evento tardio na via serrilhada<sup>21</sup>. Porém um estudo realizado com pacientes orientais demonstrou que, nestes pacientes, a metilação nesta região era um evento inicial e que a instabilidade de microssatélites seria um evento tardio<sup>19, 44</sup>. Estudos moleculares em pólipos serrilhados, comparando lesões do cólon direito e esquerdo, têm mostrado resultados contraditórios quanto à presença da mutação V600E no gene *BRAF* e a metilação de muitos genes, incluindo perda de expressão de *MLH1*. Acredita-se que a suscetibilidade à transformação maligna é diferente nas lesões do cólon direito e esquerdo, porém ainda não há definição se esta diferença é determinada pela histologia da lesão ou pelas vias moleculares distintas nessas duas localizações<sup>12, 19, 20, 42, 45</sup>.

Em um estudo de Torlakovic publicado em 2006, calculava-se que o risco dos PSS proximais progredirem para carcinoma era de 1:5 a 1:8. Atualmente acredita-se que a progressão para malignidade ocorra em 1:17 PSS, índice semelhante ao dos adenomas convencionais e o que o fumo possa ser um fator de risco para esta progressão<sup>3, 10, 21, 46</sup>. A progressão para malignidade teria início com o desenvolvimento de áreas de displasia convencional que, na histologia, se caracterizam por uma zona de transição abrupta entre o serrilhamento sem atipias citológicas e a displasia convencional (Figura 9). Essas lesões com achados combinados de alterações serrilhadas sem atipias junto a áreas com displasia

citológica correspondem a cerca de 13% dos PSS. Eram previamente classificadas como pólipos mistos hiperplásico-adenomatosos e são atualmente classificadas como pólipos sésseis serrilhados com displasia <sup>21</sup>. As áreas de displasia convencional podem apresentar atipias epiteliais de alto e baixo grau, porém é recomendado que PSS com atipias de qualquer grau sejam considerados como pólipos “avançados” com significado clínico similar aos adenomas com atipia epitelial de alto grau <sup>18</sup>. Acredita-se que PSS possam progredir para carcinoma infiltrante mais rapidamente do que os adenomas convencionais porque podem apresentar invasão precoce da camada muscular da mucosa <sup>47</sup>.



**FIGURA 9. Pólipo sésseis serrilhado com displasia. A lesão apresenta transição abrupta entre a área serrilhada sem atipias epiteliais à esquerda e a área com presença de atipia epitelial convencional à direita. HE 100x.**

Carcinomas colônicos esporádicos associados à instabilidade de microssatélites têm incidência quase exclusiva no cólon direito e é estabelecido que os PSS com displasia do cólon direito são precursores deste tipo de carcinoma <sup>21</sup>. Os carcinomas associados à instabilidade de microssatélites têm incidência em idade mais tardia e apresentam histologia mucinosa, tendendo a ser agressivos com invasão precoce da camada muscular própria, porém

com limitada expansão lateral. Alguns estudos mostram que, mesmo com potencial de infiltração mais precoce do que os carcinomas com histologia não mucinosa, essas neoplasias apresentam melhor prognóstico <sup>7</sup>. Embora a maioria dos PSS não progrida para carcinoma, a magnitude do risco é comparável a dos adenomas convencionais e estudos sugerem que o fumo aumenta o risco de carcinomas colorretais associados à via serrilhada <sup>10, 46</sup>. Alguns autores sugerem que a presença de PSS com displasia localizados no cólon proximal que medem mais de 10,0mm é um fator de risco independente para a presença de carcinoma colorretal metacrônico ou sincrônico <sup>10</sup>. Por essa razão, preconiza-se acompanhamento colonoscópico similar ao dos adenomas após a excisão total da lesão <sup>15, 17, 26, 48</sup>.



## **2.0 JUSTIFICATIVA**

## 2.0 JUSTIFICATIVA

A possibilidade de desenvolvimento de carcinoma colônico em pacientes com lesões serrilhadas do cólon que não apresentam alterações displásicas clássicas modifica o seguimento clínico. Os PSS são lesões com potencial de malignidade pela sua associação com a via da instabilidade de microssatélites, porém ainda há baixa concordância diagnóstica entre os patologistas no diagnóstico desta entidade mesmo com os avanços da literatura. A demonstração de eventuais diferenças interobservador, inclusive entre patologistas com e sem interesse especial em gastroenterologia no nosso meio, pode reforçar a necessidade de estratégias específicas nesse sentido. Ainda, mesmo com o consenso de que o carcinoma colorretal associado à instabilidade de microssatélites é quase exclusivo do cólon direito, não há um protocolo específico de acompanhamento e tratamento dos pacientes conforme a localização da lesão. Identificar possíveis diferenças moleculares entre as lesões serrilhadas sem displasia convencional diagnosticadas nos colos direito e esquerdo ajudará a estabelecer modificações no prognóstico e definir o melhor acompanhamento para os pacientes.

### **3.0 PERGUNTA DE PESQUISA**

### **3.0 PERGUNTA DE PESQUISA**

Seria a concordância diagnóstica encontrada em nosso meio semelhante ao descrito na literatura? As lesões serrilhadas sem displasia apresentam concordância diagnóstica diferente quando avaliadas por patologistas com e sem ênfase em gastroenterologia? Seria a localização anatômica mais importante que o diagnóstico histológico para a presença da expressão imuno-histoquímica das proteínas dos genes de reparo do DNA o que poderia estar associado a um potencial de malignidade nas lesões serrilhadas do cólon sem displasia?

## **4.0 OBJETIVOS**

## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a concordância diagnóstica dos PSS entre os patologistas e identificar possíveis diferenças na expressão imuno-histoquímica das proteínas dos genes de reparo do DNA dos PSS e PH, entre os cólons direito e esquerdo, para melhor elucidar a associação com a via da instabilidade de microsatélites.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a concordância intraobservador no diagnóstico dos pólipos sésseis serrilhados.
- Avaliar a concordância interobservador no diagnóstico dos pólipos sésseis serrilhados.
- Avaliar a concordância interobservador entre patologistas com e sem ênfase em gastroenterologia no diagnóstico dos pólipos sésseis serrilhados.
- Descrever a localização anatômica dos pólipos sésseis serrilhados e pólipos hiperplásicos diagnosticados no Laboratório Medicina Digital.
- Descrever a prevalência dos subtipos dos pólipos hiperplásicos.
- Descrever a prevalência de gênero dos pacientes com diagnóstico de pólipos hiperplásicos.
- Descrever a prevalência de gênero dos pacientes com diagnóstico de pólipos sésseis serrilhados.
- Descrever a média de idade dos pacientes com diagnóstico de pólipos hiperplásicos.
- Descrever a média de idade dos pacientes com diagnóstico de pólipos sésseis serrilhados.
- Avaliar a expressão das proteínas MLH1 e MSH2 em PSS e PH e correlacionar com a localização das lesões;

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas MLH1 e/ou MSH2 entre os subtipos dos pólipos hiperplásicos.

## **5.0 HIPÓTESE**



## 5.0 HIPÓTESE

A avaliação de concordância diagnóstica interobservador seria semelhante ao descrito na literatura. Quando comparados patologistas com e sem ênfase em gastroenterologia a concordância diagnóstica seria semelhante. O exame imunohistoquímico mostraria perda da expressão das proteínas MLH1 e/ou MSH2 nos PSS e nos MVHP, localizados no cólon direito. A perda da expressão das proteínas MLH1 e MSH2 seria explicada pela hipermetilação da região promotora do gene *MLH1*. Esses achados reforçariam a hipótese de que PSS possam ser derivados de PH e que o potencial maligno das lesões sem achados de displasia convencional pela via serrilhada poderia ser determinado tanto pela localização quanto pela histologia da lesão.

## **6.0 METODOLOGIA**

## 6.0 METODOLOGIA

### 6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo Transversal

### 6.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram revisadas as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina dos exames anatomopatológicos com diagnósticos de pólipos séssil serrilhado e pólipos hiperplásicos provenientes do Laboratório de Patologia Medicina Digital de Porto Alegre, realizados a partir de 2005, até se obter 26 blocos de parafina com diagnóstico de pólipos séssil serrilhado com localização no cólon direito, 26 blocos com diagnóstico de pólipos séssil serrilhado com localização no cólon esquerdo, 26 blocos com diagnóstico de pólipos hiperplásicos com localização no cólon direito e 26 blocos de parafina com diagnóstico de pólipos hiperplásicos com localização no cólon esquerdo, totalizando 104 lesões.

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa PEPI (*Programs for Epidemiologists*) versão 4.0 e baseado nos estudos de Kim et AL<sup>19</sup> e Sandmeier et AL<sup>45</sup>. Para um nível de significância de 5%, um poder de 90%, e uma diferença nos desfechos de no mínimo 50% entre os lados direito e esquerdo, obteve-se um total mínimo de 21 lesões em cada grupo, totalizando 84 amostras a serem analisadas. Considerando possíveis perdas nos exames imuno-histoquímico a amostra teve um acréscimo de 20%, totalizando 26 lesões em cada grupo e 104 lesões na soma final dos quatro grupos.

A localização das lesões foi definida como: lesões de cólon direito aquelas localizadas em ceco, cólon ascendente, ângulo hepático e cólon transverso e como lesões

de cólon esquerdo as localizadas em ângulo esplênico, cólon descendente, cólon sigmoide e transição retossigmoide<sup>19</sup>. Em um primeiro momento os exames foram diagnosticados por um patologista com ênfase em gastroenterologia a fim de se chegar ao tamanho de amostra necessário para a realização do trabalho. Após a seleção dos exames anatomopatológicos que preenchiam os critérios da pesquisa, estes foram submetidos à nova análise pelo mesmo patologista com o objetivo de se avaliar a concordância intraobservador. Os exames com discordância diagnóstica entre as duas avaliações foram excluídos. Em um segundo momento os exames anatomopatológicos selecionados pelo primeiro patologista foram revisados de forma independente por um segundo patologista com ênfase em gastroenterologia. Nos casos com concordância diagnóstica entre os dois observadores, foram realizados exames imuno-histoquímicos para avaliação da expressão das proteínas MLH1 e MSH2. Em um terceiro momento, foi realizada uma revisão dos pólipos selecionados pelos dois primeiros patologistas por um terceiro patologista que não possui ênfase em gastroenterologia. Nenhum pólipo foi excluído nesta etapa do trabalho.

### **6.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Foram excluídos os casos sem designação de localização, lesões com alterações histológicas compatíveis com displasia convencional, lesões com presença de componente inflamatório proeminente, lesões associadas à doença inflamatória intestinal ou adenocarcinoma colorretal prévio ou sincrônico.

## 6.4 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise imuno-histoquímica das proteínas de reparo nas lesões emblocadas em parafina foi realizada conforme o seguinte protocolo do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA:

### 1.0 Desparafinização e hidratação das lâminas

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 4 $\mu$ m de espessura representativos da lesão e as lâminas foram colocadas em cesto de metal na estufa a 85°C por uma hora. O cesto foi posteriormente passado para a bateria de desparafinização e hidratação que consiste de duas imersões em recipientes diferentes com xilol por quatro minutos e dois mergulhos em quatro recipientes diferentes com álcool. O cesto foi então lavado em água corrente e depois em água destilada e deixado na água destilada até começar a recuperação antigênica.

### 2.0 Recuperação antigênica

Nesta etapa as lâminas foram posicionadas cuba frisada horizontal e a cuba foi preenchida com tampão de recuperação PBS que é composto de citrato pH 6.0 e TRIS/EDTA pH 9.0 e incubada por quarenta minutos a 95°C. Após o término do ciclo programado e a temperatura alcançar menos de 90°C, a tampa foi aberta por 10 minutos para resfriar e a cuba foi retirada da câmara deixada descansar à temperatura ambiente por mais dez minutos. As lâminas então foram lavadas em água destilada por três vezes e a cuba foi preenchida com água destilada, deixado até o bloqueio da peroxidase.

### 3.0 Bloqueio da peroxidase endógena e reações inespecíficas

Após ser desprezada a água da cuba esta foi preenchida com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol e tampada por vinte minutos para que ficasse protegida da luz. A solução com metanol foi desprezada no descarte de resíduo químico apropriado e a cuba foi lavada três vezes com água destilada, e após preenchida com PBS por cinco minutos. No passo seguinte o PBS foi desprezado e a cuba foi preenchida com a solução de leite em pó desnatado a 5% por vinte minutos. Após o leite ser desprezado, a cuba foi lavada primeiramente na água corrente e depois três vezes com água destilada. Novamente a cuba foi preenchida com PBS que foi trocado após cinco minutos.

#### 4.0 Diluição do anticorpo primário

Foram utilizados dois anticorpos: Anticorpo MLH1 N-20 *rabbit* policlonal IgG da marca Santa Cruz na diluição de 1/200 e Anticorpo MSH2 H-300 *rabbit* IgG policlonal da marca Santa Cruz na diluição de 1/200.

#### 5.0 Aplicação do anticorpo primário

Os tubos com anticorpos foram agitados no vórtex e a bandeja de incubação foi preenchida com água para fazer uma câmara úmida. As lâminas que estavam na cuba com PBS foram retiradas e colocadas na bandeja de incubação para a aplicação do anticorpo. A bandeja de incubação foi então fechada por trinta minutos a temperatura ambiente e levada a geladeira por doze a dezesseis horas (*overnight*).

#### 6.0 Aplicação do kit de detecção

Nesta etapa, o kit de detecção foi retirado e a bandeja de incubação foi enxaguada com PBS para remover o anticorpo primário. As lâminas foram então colocadas na cuba horizontal com PBS por cinco minutos. Após este período o PBS foi trocado, as lâminas foram secas e colocadas novamente na bandeja de incubação, sem

que o PBS ficasse sobre o corte. O anticorpo secundário foi aplicado sobre o corte e a bandeja de incubação foi fechada por trinta minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram retiradas da bandeja de incubação e colocadas na cuba horizontal com PBS. O PBS foi trocado e, após cinco minutos, trocado novamente. As lâminas foram secas e colocadas novamente na bandeja de incubação. A enzima foi aplicada sobre o corte e a bandeja de incubação foi fechada por trinta minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram retiradas da bandeja de incubação e colocadas na cuba horizontal com PBS, que foi trocado por duas vezes a cada cinco minutos.

#### 7. Revelação, contra coloração e montagem

Nesta fase, a hematoxilina foi aquecida na estufa por cerca de quarenta minutos e a cuba foi preenchida com água destilada, colocando, então, o cesto de metal dentro. O reagente DAB foi preparado com uma gota de cromógeno para cada mL de tampão. As lâminas foram retiradas do PBS e colocadas sobre uma compressa úmida. Com a pipeta Pasteur, foi aplicado o reagente DAB sobre o corte, aguardando alguns segundos, ou até obter uma coloração caramelo. As lâminas foram então colocadas em água destilada e posteriormente lavadas por três vezes em água corrente. Após este processo, as lâminas foram colocadas na hematoxilina aquecida por cinco segundos e, após, lavadas em água corrente. Foi então secado o excesso de água, e as lâminas foram imersas em água amoniacal por trinta segundos e depois lavadas em água corrente. O excesso de água foi retirado e o cesto foi passado por quatro banhos de álcool absoluto e dois banhos de xilol. O cesto foi então colocado cuba com xilol na capela de exaustão, e por fim a lâmina foi montada com uma gota de bálsamo sobre o corte e lamínula.

A avaliação dos exames imuno-histoquímicos foi realizada por dois patologistas e a interpretação da expressão das duas proteínas, MLH1 e MSH2, foi independente.

O padrão de coloração das proteínas MLH1 e MSH2 é nuclear e a coloração nuclear dos linfócitos, células epiteliais normais ou células estromais foram utilizadas como controle interno. A expressão é considerada positiva quando há coloração nuclear em algumas células ou negativa quando há ausência de coloração nuclear. As lesões que demonstraram qualquer evidência de expressão de MLH1 ou MSH2, mesmo em pequenos focos, foram consideradas positivas. Os casos que apresentaram ausência de coloração nas células neoplásicas com inequívoca coloração do núcleo das células não neoplásicas foram classificados como mostrando expressão anormal das proteínas do dano de reparo. Lesões com coloração citoplasmática e ausência de coloração nuclear no controle interno não foram consideradas imunopositivas <sup>49, 50, 51, 52</sup>.

## 6.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas foram descritas por frequências absolutas e relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por média.

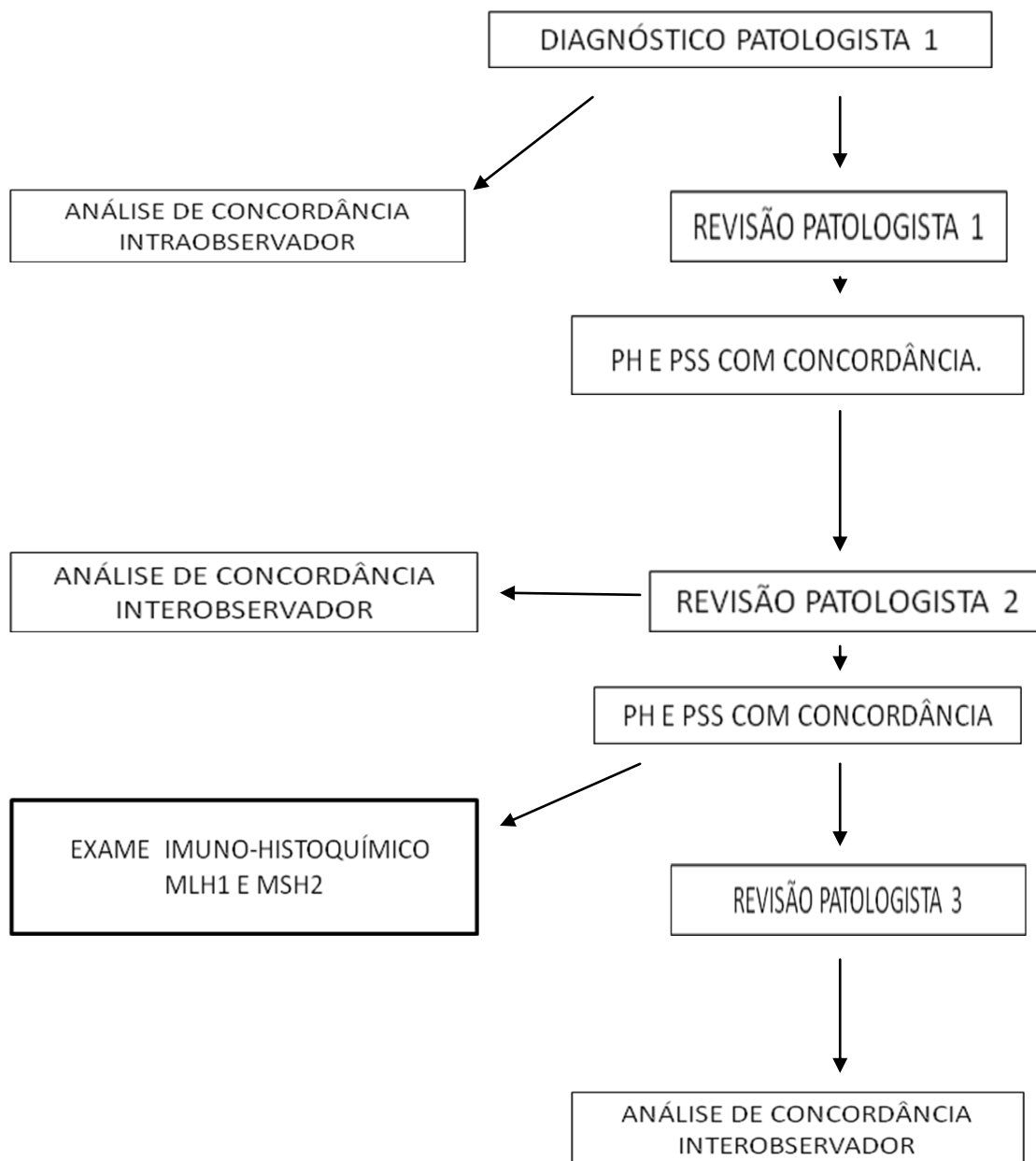
Para avaliar as concordâncias intraobservador e interobservador, o coeficiente Kappa foi aplicado.

Para comparar proporções entre os grupos, o teste T para comparação das médias de idade entre os grupos foi aplicado e o teste exato de Fischer foi aplicado para comparação das proporções entre os grupos.

O nível de significância estatística adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e as análises foram realizadas nos programas SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 21.0 e PEPI versão 4.0.

O projeto foi financiado pela FIPE e pelo Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia e Hepatologia.



**6.6 FLUXOGRAMA**

## **7.0 ASPECTOS ÉTICOS**

## **7.0 ASPECTOS ÉTICOS**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, tendo sido aprovado com o número 12-0273 CAAE:02618112.5.0000.5327.

## **8.0 RESULTADOS**

## 8.0 RESULTADOS

Primeiramente, foram selecionadas as lesões com os diagnósticos de interesse e pesquisadas as informações clínicas e exames anteriores disponíveis. Foram excluídas 56 lesões pela ausência de especificação da lateralidade, 17 lesões foram excluídas por apresentar história prévia ou atual de adenocarcinoma e uma lesão foi excluída por apresentar informação clínica de tumor carcinoide colônico prévio.

Após a revisão das lâminas pelo primeiro patologista, 3 lesões foram excluídas pela presença de inflamação associada e 3 lesões foram excluídos por apresentarem critérios de pólipos séssil serrilhado com displasia convencional. Foi excluída uma lesão por apresentar na lâmina ora fragmentos de pólipos séssil serrilhado ora de adenoma convencional com informação clínica de que se tratava de lesão única. A informação clínica fornecida faz com que os fragmentos sejam analisados em conjunto e não como lesões independentes e a conclusão diagnóstica foi de pólipos séssil serrilhado com displasia, fragmentado. A presença de artefatos físicos que prejudicavam a avaliação foi responsável pela exclusão de uma lesão. A amostra final após revisão inicial das lâminas foi de 124 lesões, sendo 64 PH e 60 PSS.

Com o objetivo de se avaliar a concordância intraobservador, as 124 amostras foram submetidas a uma segunda análise pelo mesmo patologista. Após o primeiro diagnóstico, 2 (3,1%) lesões que receberam o diagnóstico inicial de PH foram reclassificadas como mucosa colônica dentro dos limites da normalidade, sendo uma do cólon direito e uma do cólon esquerdo. Das lesões diagnosticadas como pólipos hiperplásicos, 4 (6,2%) foram reclassificadas como pólipos séssil serrilhado sendo 1 do

cólon esquerdo e três do cólon direito. Dos PSS inicialmente diagnosticados, 1 (1,7%) do cólon direito foi rediagnosticado como PH. O teste de Kappa para concordância resultou no valor de 0,89 (Apêndice 1). As lesões que resultaram em discordância diagnóstica nesta fase de avaliação foram excluídos.

As 117 lesões selecionadas na primeira avaliação foram então revisados pelo segundo patologista com ênfase em gastroenterologia. Dos 58 PH resultantes na amostra, 1 (1,7 %) pólipos do cólon direito foi diagnosticado como mucosa normal e 4 (6,9%), sendo 3 do cólon direito e 1 do cólon esquerdo, foram diagnosticados como pólipos séssil serrilhado na avaliação pelo segundo observador. Das 59 lesões diagnosticadas primeiramente como pólipos séssil serrilhado, 4 (6,8%), sendo todas do cólon direito, foram rediagnosticadas como pólipos hiperplásicos pelo segundo patologista. A variabilidade interobservador avaliada pelo teste de Kappa resultou em um valor de 0,85 (Apêndice 2).

Quando comparada a concordância diagnóstica de acordo com a localização da lesão verificou-se que entre as lesões do cólon esquerdo se obtinha maiores proporções de concordância do que as lesões do cólon direito (98,1% x 87,5%) e esta diferença apresentou significância estatística ( $p < 0,039$ ) (Apêndice 3). As lesões que não apresentaram concordância diagnóstica entre o primeiro e o segundo patologista foram excluídas das fases subsequentes do estudo.

Com o objetivo de avaliar a concordância entre os patologistas com e sem ênfase em gastroenterologia, as 108 lesões restantes foram analisados por um terceiro patologista. Das 55 lesões anteriormente diagnosticadas como pólipos séssil serrilhado 25 (45,4%), sendo 15 do cólon direito e 10 do cólon esquerdo, foram diagnosticadas como pólipos hiperplásicos pelo patologista geral. Todos os pólipos hiperplásicos diagnosticados

pelo patologista geral receberam o diagnóstico de pólipo hiperplásico pelos dois primeiros patologistas. O valor do teste Kappa para concordância entre os três patologistas foi de 0,54 (Apêndice 4).

A amostra final foi constituída por 27 PH do cólon direito, 26 PH do cólon esquerdo, 29 PSS do cólon direito e 26 PSS do cólon esquerdo. Em 97 casos, sendo 46/53 PH e 51/55 PSS, havia informação clínica que especificava a localização das lesões, sendo que, a maioria, tanto dos PH (32,6%) quanto dos PSS(31,4%), foram encontrados no cólon ascendente. Na amostra estudada houve prevalência do gênero feminino tanto em PH (61,5% de mulheres) quanto em PSS (65,5% em mulheres). Apenas em um dos 108 pacientes estudados não havia informação quanto ao gênero (Apêndice 5).

Quando comparadas as lesões conforme a lateralidade, a prevalência do gênero feminino se manteve em 74,1 % dos PH e 72,4 % dos PSS do cólon direito. No cólon esquerdo, 57,7 % dos PSS ocorriam em pacientes do gênero feminino, porém nos PH 52,0% dos pacientes eram do gênero masculino (Apêndice 6).

Quando avaliada a idade dos pacientes a média foi de 55,6 anos nos diagnosticados com PH e 59,2 nos PSS. Quando realizada a comparação da média de idade conforme a localização da lesão não se identificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Apêndice 7).

Os PH foram ainda subclassificados em MVHP, GCHP e MPHP. Foram encontrados 48 MVHP, sendo 26 (54,2%) do cólon direito, 4 GCHP, sendo 3 (75,0%) do cólon esquerdo, e 1 MPHP que era localizado no cólon esquerdo (Apêndice 8).

Quando avaliada a localização específica no cólon, a maioria dos MVHP (33,3%) foi encontrada no cólon ascendente seguida pelo cólon sigmoide (23,8%) como sítios mais comuns (Apêndice 9).

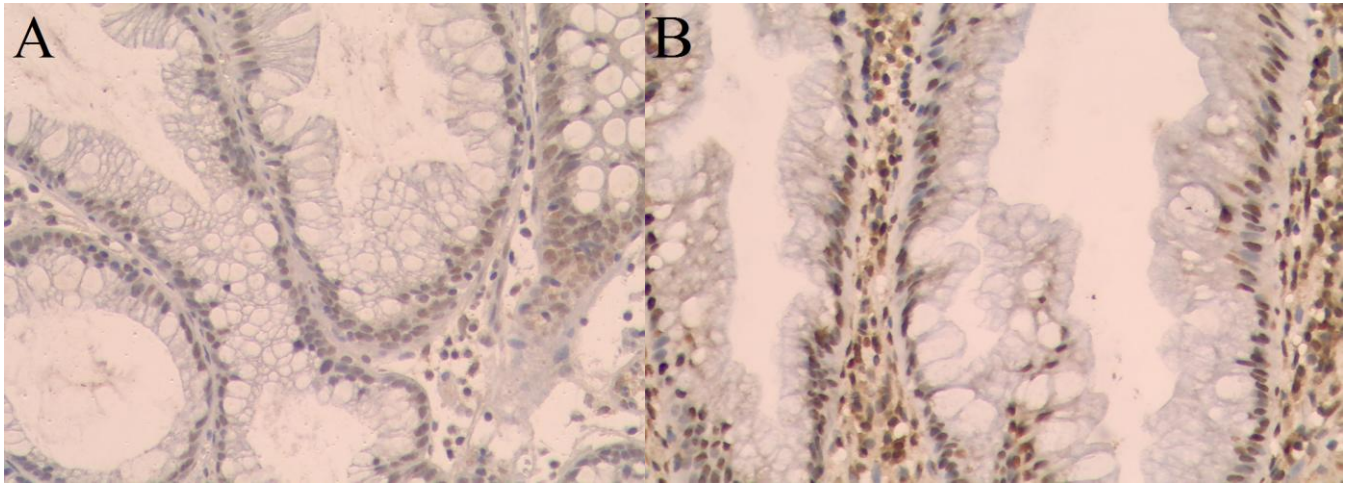
A idade média dos pacientes com o diagnóstico de MVHP foi de 56,3 anos e dos com GCHP 48,7 anos, não havendo diferenças entre as médias de idade quando os grupos foram comparados quanto à localização entre cólon direito e esquerdo. O paciente com diagnóstico de MPHP apresentava idade informada de 50 anos (Apêndice 10).

Quanto ao gênero dos pacientes, 68,1% dos pacientes com diagnóstico de MVPH eram do gênero feminino e 100% dos pacientes com GCHP eram do gênero masculino. O paciente com diagnóstico de MPHP era do gênero masculino. Ainda se identificou prevalência maior de pacientes do gênero feminino quando os grupos foram estratificados por localização das lesões nos hemicólons, sendo que 76,9% dos pacientes com diagnóstico de MVHP no cólon direito eram do gênero feminino e 57,1% dos pacientes com a mesma lesão no cólon esquerdo eram também do gênero feminino (Apêndice 11).

Durante a avaliação do exame imuno-histoquímico para a expressão da proteína do gene MLH1 foram excluídas 5 lesões, sendo 2 PSS do cólon direito, 1 pólipó sésil serrilhado do cólon esquerdo e 2 PH do cólon esquerdo, por presença de coloração citoplasmática que impedia a avaliação nuclear. Ainda, 1 pólipó hiperplásico do cólon esquerdo foi excluído por apresentar material escasso para diagnóstico. As demais 102 lesões apresentaram resultado positivo ao exame imuno-histoquímico, isto é, coloração nuclear positiva para expressão das proteínas do gene MLH1.

A avaliação da expressão da proteína do gene MSH2 ao exame imuno-histoquímico mostrou resultado positivo, isto é coloração nuclear positiva em 106 lesões examinadas, sendo que 1 pólipó hiperplásico do cólon direito foi excluído por apresentar controle interno negativo e 1 pólipó hiperplásico do cólon esquerdo foi excluído por apresentar material escasso para diagnóstico (Figura 10).





**FIGURA 10. A: Positividade da expressão da proteína MLH1 . B: Positividade para a expressão da proteína MSH2. 400x**

## **9.0 DISCUSSÃO**

## 9.0 DISCUSSÃO

O valor de Kappa encontrado de 0,89 para concordância intraobservador e 0,85 para interobservador entre os patologistas com ênfase em gastroenterologia mostra que a concordância é classificada como alta, superior ao descrito na literatura atual <sup>7, 15, 18, 28, 36</sup>. A explicação para o valor encontrado pode ser a maior experiência destes patologistas em diagnósticos de lesões do trato gastrointestinal, porém, também precisa ser considerado, que os dois patologistas receberam treinamento na mesma instituição, o que resulta em critérios diagnósticos mais homogêneos. Além disso, os patologistas envolvidos neste estudo mantêm constante discussão e recesso constante à literatura sobre as lesões serrilhadas encontradas durante sua prática diária. Quando avaliado o valor de Kappa de 0,55, resultante da comparação entre os patologistas com e sem interesse especial em gastroenterologia, verifica-se que, mesmo este valor sendo inferior ao anteriormente descrito, a classificação da concordância como moderada é semelhante à descrita na literatura em comparações entre patologistas experientes em lesões serrilhadas <sup>7,15, 18, 28, 36</sup>. Esse tipo de diferença está bem documentado, inclusive no nosso meio. Em um estudo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, avaliou-se a variabilidade interobservador no diagnóstico de pólipos hiperplásicos e adenomas convencionais, obtendo-se um valor de Kappa moderado entre os patologistas da instituição <sup>53</sup>. É importante considerar que nenhum pólipo hiperplásico diagnosticado pelo patologista geral recebeu o diagnóstico de pólipo séssil serrilhado nas avaliações anteriores. Com isso, podemos observar que a dificuldade diagnóstica está relacionada estritamente aos PSS e isso pode ser explicado pela falta de um consenso entre os autores em se definir os critérios mínimos para o diagnóstico destas lesões <sup>18</sup>. A subjetividade dos critérios

diagnósticos dos PSS, tanto dos critérios quantitativos quanto dos qualitativos, é a principal responsável pelas diferenças de discordância encontradas entre todas as avaliações. Os critérios diagnósticos quantitativos, isto é, número mínimo de criptas alteradas para o diagnóstico das lesões serrilhadas, ainda é um tópico controverso na literatura. A presença de três criptas alteradas em toda a lesão ou duas criptas adjacentes é o critério mínimo para diagnóstico de PSS no livro texto publicado pela Organização Mundial da Saúde <sup>13</sup>, porém artigos resultantes de encontros para consenso das lesões serrilhadas recomendam que uma lesão com apenas uma cripta com alterações inequívocas de pólipos séssil serrilhado já é suficiente para se estabelecer o diagnóstico <sup>13, 18, 21</sup>. Estas divergências mostram como os critérios recomendados são ainda questionáveis e abrem espaço para a criação de critérios baseados na interpretação pessoal do patologista o que causa uma extrema heterogeneidade nos diagnósticos. Ainda podemos observar que os índices de concordância diagnóstica entre os patologistas não vem aumentando, mesmo com a disponibilidade de protocolos para o diagnóstico disponíveis na literatura <sup>18</sup>. Com isso, é necessário o uso de técnicas de treinamento alternativas para o patologista geral, como o treinamento interativo por um patologista com experiência em gastroenterologia e, particularmente, em lesões serrilhadas do cólon.

Os resultados deste trabalho mostram uma proporção de discordância maior no cólon direito do que no esquerdo. Como os PSS tem maior incidência no cólon direito, nós acreditamos que alguns destes casos possam corresponder a PSS que não apresentaram todas as alterações necessárias para se estabelecer um diagnóstico definitivo e desta forma resultam em maior variabilidade na interpretação. A ocorrência de problemas técnicos como excisão incompleta ou inclusão com artefatos por tangenciamento podem ser causas desta dificuldade. Alguns autores sugerem a criação de uma categoria *borderline* entre PH e PSS para as lesões com alterações arquiteturais

intermediárias <sup>21, 37</sup>. Atualmente, o que é sugerido na literatura, é que se faça um diagnóstico descritivo da lesão ao invés de se estabelecer um diagnóstico conclusivo. Nós acreditamos que a criação de uma terceira categoria pode acarretar em ainda maior discordância diagnóstica entre os patologistas. Contudo, os diagnósticos descritivos podem resultar em considerável subjetividade de interpretação na prática clínica e dificuldade em se determinar o melhor acompanhamento e tratamento para os pacientes. Por isso, com o objetivo de se uniformizar a prática clínica em pacientes com lesões que não se enquadram em nenhum dos diagnósticos já estabelecidos, é necessária a criação de um protocolo de acompanhamento. Com este intuito, seria mais aconselhável a utilização de categorias específicas do que de avaliações descritivas.

Estudos realizados com pacientes ocidentais mostram prevalência do gênero feminino em pacientes com diagnóstico de pólipos séssil serrilhados, resultado semelhante ao encontrado nesta amostra <sup>22</sup>. Houve prevalência do gênero feminino nos pacientes que receberam o diagnóstico de pólipos hiperplásicos, porém, quando se estratificou quanto à lateralidade, esta prevalência não se manteve nos casos referidos como do cólon esquerdo. Na literatura não há consenso quanto ao gênero prevalente nos pacientes com PH <sup>18</sup>. Novos estudos são necessários para determinar se há diferença nesta prevalência conforme a localização da lesão.

A idade média dos pacientes com diagnóstico de PSS foi de 59,2 anos, resultado semelhante ao encontrado no estudo de Kumbhari e colaboradores que comparou a idade média entre pacientes orientais e ocidentais que apresentavam PSS <sup>25</sup>.

A subclassificação dos PH mostrou predomínio de MVHP (48/53 casos), seguido por GCHP (4/53 casos) e MPHP (1/53 casos). Os GCHP foram em sua maioria (3/4) detectados no cólon esquerdo e o único MPHP diagnosticado foi referido como de cólon

esquerdo. Os resultados encontrados neste estudo são compatíveis com os dados epidemiológicos descritos na literatura para os subtipos dos PH<sup>13,18</sup>.

O estudo imuno-histoquímico mostrou-se positivo tanto para expressão da proteína MLH1 quanto para MSH2 em todos os casos selecionados passíveis de avaliação. Atualmente, acredita-se que a hipermetilação dos genes de reparo do DNA seja um evento final na via serrilhada e que estes achados somente se expressam em PSS com presença de displasia convencional. Por isso, não é esperado encontrar perda de expressão das proteínas dos genes de reparo nos PSS sem displasia<sup>21</sup>. Os resultados do nosso trabalho são compatíveis com as teorias atuais.

## **10.0 CONCLUSÕES**

## 10.0 CONCLUSÕES

- A concordância diagnóstica intraobservador foi alta com valor de Kappa de 0,89 que é superior ao descrito na literatura.
- A concordância diagnóstica interobservador foi alta com valor de Kappa de 0,85 para comparação entre patologistas com ênfase em gastroenterologia que também é superior ao descrito na literatura.
- A concordância diagnóstica foi moderada com valor de Kappa de 0,55 para comparação entre patologistas com e sem ênfase em gastroenterologia o que é semelhante ao descrito na literatura.
- Dos PH avaliados que possuíam informação de localização 15 eram do cólon ascendente, 11 do cólon sigmoide, 7 do cólon descendente, 6 do ceco, 4 do ângulo hepático, 2 do retossigmoide e 1 do ângulo esplênico.
- Dos PSS avaliados que possuíam informação de localização 16 eram do cólon ascendente, 13 eram do sigmoide, 10 eram do cólon descendente, 6 eram do cólon transversal, 3 do ceco e 3 do ângulo hepático.
- Após a categorização dos PH em subtipos, encontramos 48 MVHP, 4 GCHP e 1 pólipo hiperplásico do tipo pobre em mucina.
- Na amostra estudada houve prevalência do gênero feminino tanto para os pacientes diagnosticados com PH quanto para PSS.
- A média de idade dos pacientes com diagnóstico de pólipo hiperplásico foi de 55,6 anos.
- A média de idade para os pacientes com diagnóstico de pólipo séssil serrilhado foi de 59,2 anos.



- Todas as lesões avaliadas apresentaram expressão das proteínas MLH1 e MLH2.

## **11.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 11.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits Am, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine* 1988; 1;319 (9):525-32.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
3. Torlakovic E, Snover DC. Sessile Serrated Adenoma: A Brief History and Current Status. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2006; 12(1-2): 27-39.
4. Jass JR. Serrated route to colorectal cancer: back street or super highway? *The Journal of Pathology*. 2001;193:283–285.
5. Pino MS, Chung DC. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 2010;138(6): 2059-2072.
6. Grady WM, Carethers JM. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2008;135: 1079-1099.
7. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2010;138: 2088-2100.
8. Suehiro Y, Hinoda Y. Genetic and epigenetic changes in aberrant crypt foci and serrated polyps. *Cancer Science* 2008; 99(6): 1071-1076.
9. Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.
10. Sweetser S, Smyrk TC, Sinicrope FA. Serrated Colon Polyps as Precursors to Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013;11:760–767.
11. Lanza G, et al. Immunohistochemical Pattern of MLH1/MSH2 Expression Is Related to Clinical and Pathological Features in Colorectal Adenocarcinomas with Microsatellite Instability. *Modern Pathology* 2002; 15(7): 741-749.
12. Vaughn CP, Wilson AR, Samowitz WS. Quantitative evaluation of CpG island methylation in hyperplastic polyps. *Modern Pathology* 2010; 23: 151-156.
13. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. *WHO Classification of Tumors of the Digestive System*. Lyon: IARC, 2010.

14. Blanes A, Diaz-Cano SJ. Complementary analysis of microsatellite tumor profile and mismatch repair defects in colorectal carcinomas. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 7;12(37): 5932-5940.
15. Farris AB et al. Sessile Serrated Adenoma: Challenging Discrimination From Other Serrated Colonic Polyps. *The American Journal of Surgical Pathology* 2008; 32: 30-35.
16. Batts KP. Serrated Colorectal Polyps An Update. *Pathology Case Reviews* 2004; 9: 173 - 182.
17. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated Polyps of the Large Intestine: A Morphologic and Molecular Review of an Evolving Concept. *American Journal of Clinical Pathology* 2005;124 (3): 380-391.
18. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *The American Journal of Gastroenterology* 2012; 107:1315–29.
19. Kim KM, et al. Molecular Features of Colorectal Hyperplastic Polyps and Sessile Serrated Adenoma/Polyps From Korea. *The American Journal of Surgical Pathology* 2011; 35(9): 1274-1286.
20. Torlakovic E, et al. Morphologic Reappraisal of Serrated Colorectal Polyps. *The American Journal of Surgical Pathology* 2003; 27(1): 65-81.
21. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013; 62: 367–386.
22. Lash RH, Genta RM, Schuler CM. Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *Journal of Clinical Pathology* 2010; 63:681-686.
23. Leedham S, East JE, Chetty R. Diagnosis of sessile serrated polyps/adenomas: what does this mean for the pathologist, gastroenterologist and patient? *Journal of Clinical Pathology* 2013; 66 ( 4):265-268.
24. Jass JR. Hyperplastic-like Polyps as Precursors of Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 2003;119: 773-775.
25. Kumbhari V, Behary J, Hui JM. Prevalence of adenomas and sessile serrated adenomas in Chinese compared with Caucasians. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28: 608–612.
26. Montgomery E. Serrated Colorectal Polyps: Emerging Evidence Suggests the Need for a Reappraisal. *Advances in Anatomic Pathology* 2004; 11(3): 143-149.
27. Kim MJ, Lee EJ, Chun SM, Jang SJ, Kim CH, Seo JP, Kim DS, Lee DH, Lee SH, Youk EG. Pedunculated Serrated Polyp with Histologic Features of Sessile Serrated

Adenoma: A Clinicopathologic and Molecular Study. *The American Journal of Surgical Pathology* 2013; 37(7):1039-1043.

28. Nakao Y, Saito S, Ohya T, Aihara H, Arihiro S, Kato T, Ikegami M, Tajiri H. Endoscopic features of colorectal serrated lesions using image-enhanced endoscopy with pathological analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2013; 25(8):981-988.

29. Kimura T, Yamamoto E, Yamano H, Suzuki H, PhD, Kamimae S et al. A Novel Pit Pattern Identifies the Precursor of Colorectal Cancer Derived From Sessile Serrated Adenoma. *The American Journal of Gastroenterology* 2012; 107(3):460-469.

30. Kudo S, Hirota S, Nakajima T, Hosobe S, Kusaka H et al. Colorectal tumours and pit pattern. *Journal of Clinical Pathology* 1994; 47: 880-885.

31. Hasegawa S, Mitsuyama K, Kawano H, Arita K, Maeyama Y, Akagi Y, Watanabe Y, Okabe Y, Tsuruta O, Sata M. Endoscopic discrimination of sessile serrated adenomas from other serrated lesions. *Oncology Letters* 2011; 2: 785-789.

32. Hazewinkel Y, López-Cerón, M, East JE, Rastogi A, Maria Pellisé M et al. Endoscopic features of sessile serrated adenomas: validation by international experts using high-resolution white-light endoscopy and narrow-band imaging. *Gastrointestinal Endoscopy* 2013; 77:916-924.

33. Orłowska J. Serrated lesions and hyperplastic (serrated) polyposis relationship with colorectal cancer: classification and surveillance recommendations. *Gastrointestinal Endoscopy* 2013; 77(6): 858-871.

34. Baron TH, Smyrk TC, Rex DK. Recommended Intervals between Screening and Surveillance Colonoscopies. *Mayo Clinic Proceedings* 2013; 88(8):854-858.

35. Li SC, Burgart L. Histopathology of Serrated Adenoma, Its Variants, and Differentiation From Conventional Adenomatous and. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2007;131: 440-445.

36. Bustamante-Balén M, Bernet L, Cano R, Morell L, López A. Assessing the reproducibility of the microscopic diagnosis of sessile serrated adenoma of the colon. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas (Madrid)*, 2009: Vol. 101; N.º 4: 258-264.

37. Mohammadi M, Bzorek M, Bonde JH, Nielsen HJ, Holck S. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *Journal of Clinical Pathology* 2013;66:403-408.

38. Huang CC, Frankel WL, Doukides, Zhou XP, Zhao W, Yearsley MM. Prolapse-related changes are a confounding factor in misdiagnosis of sessile serrated adenomas in the rectum. *Human Pathology* 2013; 44: 480-486.

39. Jass JR, et al. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphologic features of serrated polyps and adenomas: concept of a "fusion" pathway to colorectal cancer. *Histopathology* 2006; 49(2): 121-131.
40. Spring KJ, et al. High Prevalence of Sessile serrated Adenomas With BRAF Mutations: A Prospective Study of Patients Undergoing Colonoscopy. *Gastroenterology* 2006; 131:1400-1407.
41. O'Brien MJ, et al. Hyperplastic (Serrated) Polyps of the Colorectum: Relationship of the CpG Island Methylator Phenotype and K-ras Mutation to Location and Histologic Subtype. *The American Journal of Surgical Pathology* 2004; 28(4): 423-434.
42. Gibson JA, Hahn HP, Shamsafaei A, Odze RD. MUC expression in hyperplastic and serrated colonic polyps: lack of specificity of MUC6. *The American Journal of Surgical Pathology* 2011; 35(5): 742-749.
43. Gonzalo DH, Lai KK, Shadrach B, Goldblum JR, Bennett AE et al. Gene expression profiling of serrated polyps identifies annexin A10 as a marker of a sessile serrated adenoma/polyp. *The Journal of Pathology* 2013; 230: 420-429.
44. Goldstein NS. Serrated Pathway and APC (Conventional)-Type Colorectal Polyps Molecular-Morphologic Correlations, Genetic Pathways, and Implications for Classification. *American Journal of Clinical Pathology* 2006; 125:146-153.
45. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology* 2009; 55: 206-2213.
46. Higuchi T, Jass JR. My approach to serrated polyps of the colorectum. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 682-686.
47. Sheridan TB, et al. Sessile Serrated Adenomas With Low- and High-Grade Dysplasia and Early Carcinomas An Immunohistochemical Study of Serrated Lesions "Caught in the Act". *American Journal of Clinical Pathology* 2006; 126: 564-571.
48. Salaria SN, Streppel MM, Lee LA, Iacobuzio-Donahue CA, Elizabeth A. Montgomery EA. Sessile serrated adenomas: high-risk lesions? *Human Pathology* 2012; 43(11):1808-1814.
49. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Archiv* 2004; 444:135-141.
50. Shia J, Klimstra D S, Nafa K, Offit K, Guillem JG, Markowitz AJ, Gerald WL, Ellis NA. Value of Immunohistochemical Detection of DNA Mismatch Repair Proteins in Predicting Germline . *The American Journal of Surgical Pathology* 2005; 29(1): 96-104.

51. Shia J. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing for Screening Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *Journal of Molecular Diagnostics* 2008; 10(4):293-300.
52. Overbeek LIH, Ligtenberg MJL, Willems RW, Hermens RPMG, Blokx wam et al. Interpretation of Immunohistochemistry for Mismatch Repair Proteins is Only Reliable in a Specialized Setting. *The American Journal of Surgical Pathology* 2008; 32:1246–1251.
53. Cerato MM, Cerato NL, Meurer L, Edelweiss, MI, Putten AC, Golbspan L. Variabilidade Interobservador no Diagnóstico Histológico dos Pólipos Colorretais. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2007; 27(1)7-15.

## 12.0 ARTIGO ORIGINAL



## 12.0 ARTIGO ORIGINAL

### INTRA- AND INTEROBSERVER VARIABILITY IN THE DIAGNOSIS OF SERRATED POLYPS OF THE RIGHT AND LEFT COLON

SHORT TITLE: ASSESSMENT OF DIAGNOSTIC AGREEMENT IN SESSILE  
SERRATED POLYPS

Authors: CASTANHO JC\*(1), RIVERO RC(2), MEURER L(1,2,3)

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS. Brasil.
2. Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre-RS. Brasil
3. Laboratório Medicina Digital. Porto Alegre-RS. Brasil

\*Rua Anita Garibaldi 233, 90450-001. Porto Alegre-RS. Brazil.  
[jacastanho@gmail.com](mailto:jacastanho@gmail.com)

**Keywords:** Sessile serrated polyp. Diagnosis. Interobserver agreement.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Studies of interobserver agreement among pathologists for the diagnosis of hyperplastic polyps (HPPs) and sessile serrated polyps (SSPs) have demonstrated substantial interobserver variability, even amidst experts in gastrointestinal pathology. **OBJECTIVE:** To identify differences in diagnostic concordance that could justify specific strategies to improve diagnostic uniformity.

**METHODS:** One hundred twenty-four anatomic pathology specimens with a diagnosis of SSP or HPP were examined by two pathologists with a special interest in gastroenterology (specialists) and one general pathologist. **RESULTS:** Two assessments were conducted by one of the specialist pathologists to determine intraobserver agreement. Of the 64 HPP specimens, 2 of the entire sample (3.1%) were reclassified as normal colonic mucosa and 4 (6.2%) were reassessed as SSPs. Of the 60 lesions initially diagnosed as SSPs, 1 (1.7%) was reclassified as HPPs. The kappa statistic for agreement was 0.89. The 117 specimens in which there were no diagnostic disagreements were then reassessed by the second specialist pathologist. Of 58 HPPs, 1 (1.7%) was reclassified as normal colonic mucosa and 4 (6.9%) were reclassified as SSPs. Of 59 the SSPs, 4 (6.8%) were reclassified as HPPs by the second pathologist. This interobserver variability yielded a kappa value of 0.85. Finally, the 108 specimens in which there were no diagnostic disagreements in the preceding assessments were reviewed by a third pathologist with no special interest in gastroenterology. Of 55 SSPs, 25 (45.4%) were diagnosed as HPPs by the general pathologist. All HPPs diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as such by the two specialist pathologists. The kappa value for agreement among the three pathologists was 0.54. **CONCLUSION:** The kappa values of 0.89 for intraobserver agreement and 0.85 for interobserver agreement between the

gastrointestinal pathologists are indicative of substantial agreement. The kappa value of 0.55 for comparison among pathologists with and without a special interest in gastroenterology indicates moderate agreement. It is worth noting that no hyperplastic polyps diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as sessile serrated adenoma on previous assessments. Therefore, we conclude that diagnostic difficulty is strictly associated with SSPs, which may be explained by the subjective nature of diagnosis of these lesions.

**Keywords:** Sessile serrated polyp. Diagnosis. Interobserver agreement.

## INTRODUCTION

Serrated colorectal lesions may be divided into traditional serrated adenomas (SAs), hyperplastic polyps (HPPs), and sessile serrated polyps (SSPs)<sup>1, 2</sup>. Many studies have demonstrated the importance of accurate differential diagnosis of these lesions in view of the differences in prognosis of the two lesions. HPPs and SSPs are non-dysplastic lesions, whereas SAs exhibit conventional dysplasia<sup>3</sup>. HPPs cannot progress to carcinoma. Conversely, both SAs and SSPs progress to colorectal carcinoma: the former are associated with hypermethylation, and the latter are precursors of colorectal carcinomas with microsatellite instability<sup>4, 5</sup>. Studies of interobserver agreement among pathologists for the diagnosis of serrated colonic lesions, particularly HPPs and SSPs, have shown substantial interobserver variability, even among experts in gastrointestinal pathology. Agreement is moderate at best, and has not improved despite the definition of minimum criteria for the diagnosis of SSP<sup>6, 7, 8, 9, 10</sup>.

SSPs are asymptomatic and most commonly affect the right colon, but are not restricted to this location<sup>11, 12</sup>. In the Western world, SSPs are more prevalent in women, whereas in Asian populations they are more common in men. Diet and other lifestyle factors are believed to contribute to this difference<sup>13, 14, 15</sup>.

On microscopic examination, SSPs are characterized by so-called architectural dysplasia and exhibit marked serration extending from the base to the surface of the polyp<sup>4, 16</sup>. Crypts have a disorganized appearance, with luminal dilatation and presence of mucin<sup>17</sup>. Some crypts exhibit growth parallel to the muscularis mucosa, thus taking on an inverted-T or L shape, which is characteristic of these lesions<sup>10, 16, 18</sup>. There may be nuclear pseudostratification, irregular nuclear contours, small prominent nucleoli, and mitoses that are most prominent at the base of the crypts, but may occur in the upper third or even on the surface top the crypts<sup>8, 16</sup>. Unlike HPPs, SSPs exhibit cell differentiation at

the base of the crypts, with presence of goblet cells or gastric foveolar cells; there may also be marked dilatation of the base of the crypts. As the diagnostic criteria for SSP are essentially related to the base of the crypt, excessively superficial or poorly oriented biopsy specimens will hinder differential diagnosis, as the surface epithelium is similar in SSPs and HPPs<sup>16</sup>. This diagnostic challenge is most pronounced in lesions of the right colon in which the specimens were fragmented, partially excised or smaller than 5.0 mm. Lesions with intermediate features are also difficult to diagnose, especially when there is dilatation of the base of the crypt and abundant mucin in the lumen, but no architectural distortion or marked serration<sup>4, 7, 10, 16</sup>. Some authors have suggested the creation of a borderline category between microvesicular hyperplastic polyp (MVHP) and SSP for lesions in which at least one of the following structural changes is unequivocally present: basal dilatation of the crypt, basal crypt serration, or horizontal crypt growth. This category would also apply to lesions containing two areas suggestive of these changes, but not unequivocally so<sup>1, 19</sup>. According to the World Health Organization classification, the diagnosis of SSP requires such findings as crypt dilation, serration from the base of the crypt, and presence of differentiated cells at the base in at least three crypts overall or in two adjacent crypts, although some authors suggest that the presence of a single crypt with unequivocal architectural distortions suffices for a diagnosis of SSP<sup>1, 4, 8</sup>.

The possibility of development of colonic carcinoma in patients with serrated lesions of the colon presenting without classic dysplastic changes should modify clinical follow-up practices<sup>15, 20, 21, 22</sup>. SSPs are lesions with the potential for malignant transformation in view of their association with the microsatellite instability pathway, but diagnostic agreement among pathologists for the diagnosis of this disease entity is still low, despite advances in the description of the diagnostic criteria, as shown in the literature<sup>6, 7, 8, 9, 10</sup>. The finding of interobserver differences, including differences

between general pathologists and pathologists with a particular interest in gastroenterology, may stress the need for specific strategies to address this issue.

## **MATERIALS AND METHODS**

The study sample comprised 132 anatomical pathology specimens (hematoxylin/eosin-stained slides) that had been diagnosed as SSPs or HPPs at Medicina Digital, a private pathology laboratory in Porto Alegre, Brazil, since 2005.

Lesions were defined as right colon lesions if located in the cecum, ascending colon, hepatic flexure, or transverse colon, and as left colon lesions if located in the splenic flexure, descending colon, sigmoid colon, or rectosigmoid junction<sup>13</sup>. Initially, the specimens were examined and diagnosed by a pathologist with a special interest in gastroenterology. After the screening of specimens for study eligibility, those that met the study criteria were reexamined by the same pathologist for assessment of intraobserver agreement. In case of diagnostic disagreement between the first and second examinations, the corresponding specimens were excluded from further analysis. For the second stage of the study, the specimens selected by the first pathologist were independently reviewed by another pathologist with a special interest in gastroenterology. In case of disagreement between the diagnoses of the first and second specialist pathologists, the corresponding specimens were excluded from further analysis. Finally, for the third stage of the study, the specimens selected by the first and second pathologists were reviewed by a third pathologist with no special interest in gastroenterology. Specimens with no indication of site, histological changes consistent with conventional dysplasia, presence of a prominent inflammatory component, evidence of inflammatory bowel disease, or from patients with a past or current history of colorectal adenocarcinoma were excluded.

The kappa coefficient was used to assess intra- and interobserver agreement. The significance level was set at 5% ( $p \leq 0.05$ ), and all analyses were carried out in the SPSS 21.0 or PEPI 4.0 software environment.

## RESULTS

After review of slides by the first pathologist, three lesions were excluded due to presence of inflammation and four were excluded because they met criteria for SSP with conventional dysplasia. Finally, one lesion was excluded due to the presence of physical artifacts that hindered analysis. The final sample after initial examination of the selected slides, consisted of 124 lesions.

To evaluate intraobserver agreement, these 124 specimens were reexamined by the same pathologist. After this reassessment, 2 (3.1%) specimens originally diagnosed as HPPs (one from the right colon and one from the left colon) were reclassified as colonic mucosa within normal limits. Of the 60 lesions originally diagnosed as SSPs, 1 (1.7%) additional right colon polyp was reclassified as HPP, and of those 64 initially diagnosed as HPPs, 4 (6.2%) were reclassified as SSPs (one from the left colon and three from the right colon). The kappa coefficient for agreement was 0.89. Specimens that led to diagnostic disagreement in this preliminary stage were excluded from subsequent analyses.

The 117 specimens selected at the first assessment were then reviewed by a second pathologist with a special interest in gastroenterology. Of the 58 HPPs remaining in the sample, 1 (1.7%) right colon lesion was reclassified as normal mucosa and 4 (6.9%), three from the right colon and one from the left colon, were diagnosed as SSPs by the second pathologist. Of the 59 lesions originally diagnosed as SSPs, 4 (6.8%), all from

the right colon, were reassessed as HPPs by the second pathologist. The kappa value for interobserver variability was 0.85.

Comparative analysis of diagnostic agreement by lesion site showed significantly greater agreement in specimens from the left colon than in specimens from the right colon (98.1% vs. 87.5%,  $p=0.039$ ).

To assess agreement among pathologists with a special interest in gastroenterology and those with no such expertise, the 108 remaining polyps were analyzed by a general pathologist. Of the 55 lesions previously diagnosed as SSPs, 25 (45.4%) – 15 from the right colon and 10 from the left colon – were classified as HPPs by the general pathologist. All other HPPs diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as such by the two expert pathologists. The kappa statistic for agreement between the pathologists with a special interest in gastroenterology and the general pathologist was 0.54.

The final sample comprised 27 right colon HPPs, 26 left colon HPPs, 29 right colon SSPs, and 26 left colon SSPs. The mean age of the patients from whom the specimens had been obtained was 57.4 years overall (55.6 among patients with a diagnosis of HPP and 59.2 years among those with a diagnosis of SSP). Women accounted for 63.6% of the overall sample, 61.5% of patients with HPP, and 65.5% of patients with SSP.

On comparative analysis of lesions by side, a female predominance remained in the right colon HPPs (74.1%), in the right colon SSPs (72.4%), and in the left colon SSPs (57.7%). Conversely, most patients with left colon HPPs (52.0%) were male.



## DISCUSSION

The epidemiological data found in this study are similar to those described elsewhere in the literature, which show a female predominance among patients diagnosed with SSAs<sup>14</sup>. There is no consensus in the literature as to gender predominance in HPPs<sup>8</sup>. In the present study, HPPs were also more common in women, but, after stratification of lesions by side, this increased prevalence did not hold for lesions located in the left colon. Further studies are required to determine whether a difference in female prevalence exists according to lesion site.

The mean age of patients with a diagnosis of SSP was 59.2 years, which is similar to that reported in a study comparing mean age at diagnosis in Chinese vs. Caucasian patients<sup>12</sup>.

The kappa values of 0.89 for intraobserver agreement and 0.85 for interobserver agreement between the two pathologists with a special interest in gastroenterology are indicative of substantial agreement, superior to that reported in the current literature<sup>7, 8</sup>. This may be explained by the expertise of these pathologists in diagnosis of gastrointestinal tract lesions, but it is worth noting that both pathologists were trained at the same institution, which leads to more consistent diagnostic criteria. Furthermore, the pathologists involved in this study routinely discuss this issue and review the literature on serrated lesions they encounter in daily practice. The kappa value of 0.55 for comparison between the two pathologists with a special interest in gastroenterology and the general pathologist, despite being lower than those reported above, is indicative of moderate agreement and is thus consistent with the values described in other comparisons of pathologists with experience in serrated lesions<sup>7</sup>. Again, it should be noted that all pathologists involved in this study trained at the same institution, which might increase the relevance of subspecialties in surgical pathology. Such differences are well-

documented, including in Brazilian studies. One study carried out at Hospital de Clínicas de Porto Alegre assessed interobserver variability in the diagnosis of HPPs and conventional adenomas, and found moderate agreement among staff pathologists<sup>23</sup>.

Notably, in the present study, no HPPs diagnosed by the general pathologist had been diagnosed as SSPs on previous examinations. Therefore, we conclude that difficulty in establishing the diagnosis is strictly related to SSPs, which may be explained by the lack of a consensus definition of the minimal criteria for diagnosis of these lesions<sup>8</sup>. The subjectivity of diagnostic criteria for SSPs, both quantitative and qualitative, largely accounts for the differences in agreement observed in different assessments. The quantitative diagnostic criteria for SSP (i.e., the minimum number of altered crypts to establish a diagnosis of serrated lesion) is still a topic of controversy in the literature. The presence of three altered crypts across the entire lesion or two adjacent altered crypts is the minimum criterion for diagnosis of SSP in the World Health Organization classification<sup>4</sup>, but consensus statements of expert panels on serrated lesions recommend that the presence of a single crypt with unequivocal features of SSA is sufficient to establish the diagnosis<sup>1, 4, 8</sup>. These divergences demonstrate the extent to which the recommended criteria are still questionable, and leave room for the development of criteria based on the pathologists personal interpretations, which result in extreme diagnostic heterogeneity. Furthermore, rates of diagnostic agreement among pathologists have not increased despite the availability of protocols for diagnosis in the literature<sup>8</sup>. Hence, it is paramount that general pathologists receive training in the diagnosis of these lesions by alternative methods, such as interactive guidance from a pathologist with expertise in gastroenterology, particularly in serrated lesions of the colon.

The results of this study show a greater rate of diagnostic disagreement in right colon lesions as compared with left colon lesions. As the incidence of SSPs is greater in

the right colon, we believe some of these cases may correspond to SSPs that did not exhibit all of the features required to establish a definitive diagnosis, resulting in greater variability in interpretation. Technical issues such as incomplete excision or embedding or tangential sectioning artifacts may also cause such difficulties. Some authors have suggested the creation of a borderline category between HPP and SSP for lesions with intermediate architectural features<sup>1, 19</sup>. Currently, the literature suggests that, in such cases, the pathologist should provide a descriptive diagnosis of the lesion rather than attempt to establish a conclusive diagnosis. We believe the creation of a third category may lead to even greater diagnostic disagreement among pathologists. However, descriptive diagnoses may also lead to considerable subjectivity in interpretation in clinical practice, and may hinder the determination of the best follow-up and treatment strategies for patients. Hence, follow-up protocols should be created to enable consistent clinical practices in patients with lesions that do not meet the criteria for existing diagnostic entities. For this purpose, we believe the use of specific diagnostic categories would be preferable to descriptive assessments.

## REFERENCES

1. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013; 62: 367–386.
2. Torlakovic E, Snover DC. Sessile Serrated Adenoma: A Brief History and Current Status. *Critical Reviews in Oncogenesis* 2006; 12(1-2): 27-39.
3. Vakiani E, Yantiss R. Pathologic Features and Biologic Importance of Colorectal Serrated Polyps. *Advances of Anatomic Pathology* 2009;16 (2) :79-91.
4. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of Tumors of the Digestive System. Lyon: IARC, 2010.
5. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated Polyps of the Large Intestine: A Morphologic and Molecular Review of an Evolving Concept. *American Journal of Clinical Pathology* 2005;124 (3): 380-391.

6. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 2010;138: 2088-2100.
7. Farris AB et al. Sessile Serrated Adenoma: Challenging Discrimination From Other Serrated Colonic Polyps. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 30-35.
8. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, et al. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1315–29.
9. Nakao Y, Saito S, Ohya T, Aihara H, Arihiro S, Kato T, Ikegami M, Tajiri H. Endoscopic features of colorectal serrated lesions using image-enhanced endoscopy with pathological analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2013; 25(8):981-988.
10. Bustamante-Balén M, Bernet L, Cano R, Morell L, López A. Assessing the reproducibility of the microscopic diagnosis of sessile serrated adenoma of the colon. *REV ESP ENFERM DIG (Madrid)*, 2009: Vol. 101; N.º 4: 258-264.
11. Jass JR. Hyperplastic-like Polyps as Precursors of Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *Am J Clin Pathol* 2003;119: 773-775.
12. Kumbhari V, Behary J, Hui JM. Prevalence of adenomas and sessile serrated adenomas in Chinese compared with Caucasians. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28: 608–612.
13. Kim KM, et al. Molecular Features of Colorectal Hyperplastic Polyps and Sessile Serrated Adenoma/Polyps From Korea. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(9): 1274-1286.
14. Lash RH, Genta RM, Schuler CM. Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J Clin Pathol* 2010; 63:681-686.
15. Leedham S, East JE, Chetty R. Diagnosis of sessile serrated polyps/adenomas: what does this mean for the pathologist, gastroenterologist and patient? *J Clin Pathol* 2013; 66 (4):265-268.
16. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated Polyps of the Large Intestine: A Morphologic and Molecular Review of an Evolving Concept. *Am J Clin Pathol* 2005;124 (3): 380-391.
17. Batts KP. Serrated Colorectal Polyps An Update. *Pathology Case Reviews* 2004; 9: 173 - 182.
18. Li SC, Burgart L. Histopathology of Serrated Adenoma, Its Variants, and Differentiation From Conventional Adenomatous and. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131: 440-445.

19. Mohammadi M, Bzorek M, Bonde JH, Nielsen HJ, Holck S. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol* 2013;66:403–408.

20. Sweetser S, Smyrk TC, Sinicrope FA. Serrated Colon Polyps as Precursors to Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2013;11:760–767.

21. Orłowska J. Serrated lesions and hyperplastic (serrated) polyposis relationship with colorectal cancer: classification and surveillance recommendations. *Gastrointestinal Endoscopy* 2013; 77(6): 858-871

22. Baron TH, Smyrk TC, Rex DK. Recommended Intervals Between Screening and Surveillance Colonoscopies. *Mayo Clinic Proceedings* 2013; 88(8):854-858.

23. Cerato MM, Cerato NL, Meurer L, Edelweiss, MI, Putten AC, Golbspan L. Variabilidade Interobservador no Diagnóstico Histológico dos Pólipos Colorretais. *Revista Brasileira de Coloproctologia* 2007;27(1)7-15.

#### ASSESSMENT OF INTRA-OBSERVER AGREEMENT

			P1		Total
			HPP	SSP	
WNL	Count	2	0	2	
	% of Total	1.6%	0.0%	1.6%	
P1.1 HPP	Count	58	1	59	
	% of Total	46.8%	0.8%	47.6%	
SSP	Count	4	59	63	
	% of Total	3.2%	47.6%	50.8%	
Total	Count	64	60	124	
	% of Total	51.6%	48.4%	100.0%	

**Table 1: P1: first assessment by pathologist with a special interest in gastroenterology. P1.1: second assessment by same pathologist. WNL, within normal limits. HPP, hyperplastic polyp. SSP, sessile serrated polyp.**

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.89	.043	9.971	,000
N of Valid Cases		124			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

**ASSESSMENT OF INTEROBSERVER AGREEMENT BETWEEN TWO PATHOLOGISTS WITH A  
SPECIAL INTEREST IN GASTROENTEROLOGY**

			P2			Total
			WNL	HPP	SSP	
P1.2	HPP	Count	1	53	4	58
		% of Total	0.9%	45.3%	3.4%	49,6%
	SSP	Count	0	4	55	59
		% of Total	0.0%	3.4%	47.0%	50,4%
Total	Count	1	57	59	117	
	% of Total	0,9%	48.7%	50.4%	100.0%	

**Table 2. P1.2: sample resulting from the two assessments carried out by the first pathologist. P2: assessment carried out by the second pathologist with a special interest in gastroenterology. WNL, within normal limits. HPP, hyperplastic polyp. SSP, sessile serrated polyp.**

## Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	.847	.048	9.285	,000
N of Valid Cases		117			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

**ASSESSMENT OF INTEROBSERVER AGREEMENT BETWEEN PATHOLOGISTS  
WITH AND THOSE WITHOUT A SPECIAL INTEREST IN GASTROENTEROLOGY**

			P3		Total
			HPP	SSP	
P1.3	HPP	Count	53	0	53
		% of Total	49.1%	0.0%	49,1%
	SSP	Count	25	30	55
		% of Total	23.1%	27.8%	50,9%
Total	Count	78	30	108	
	% of Total	72,2%	27.8%	100.0%	

**Table 3. P1.3: sample resulting from assessment by two pathologists with a special interest in gastroenterology. P3: assessment carried out by a pathologist with no special interest in gastroenterology. HPP: hyperplastic polyp. SSP: sessile serrated polyp.**

**Symmetric Measures**

	Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement      Kappa	.541	.072	6.327	,000
N of Valid Cases	108			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.



## APÊNDICE 1

## AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA INTRAOBSERVADOR

			P1		Total
			PH	PSS	
	DLN	Count	2	0	2
		% of Total	1,6%	0,0%	1,6%
P1.1	PH	Count	58	1	59
		% of Total	46,8%	0,8%	47,6%
	PSS	Count	4	59	63
		% of Total	3,2%	47,6%	50,8%
Total		Count	64	60	124
		% of Total	51,6%	48,4%	100,0%

**P1: primeira avaliação realizada pelo patologista com ênfase em gastroenterologia;**  
**P1.1: segunda avaliação realizada pelo mesmo patologista.**

## Teste Kappa para concordância

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,89	,043	9,971	,000
N of Valid Cases		124			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## APÊNDICE 2

### AVALIAÇÃO DE CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR ENTRE PATOLOGISTAS COM ÊNFASE EM GASTROENTEROLOGIA

		P2			Total	
		DLN	PH	PSS		
P1.2	PH	Count	1	53	4	58
		% of Total	0,9%	45,3%	3,4%	49,6%
	PSS	Count	0	4	55	59
		% of Total	0,0%	3,4%	47,0%	50,4%
Total	Count	1	57	59	117	
	% of Total	0,9%	48,7%	50,4%	100,0%	

**P1.2:** amostra resultante das duas avaliações realizadas pelo primeiro patologista. **P2:** avaliação realizada pelo segundo patologista com ênfase em gastroenterologia.

#### Teste Kappa de concordância interobservador entre patologistas com ênfase em gastroenterologia

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,847	,048	9,285	,000
N of Valid Cases		117			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

### APÊNDICE 3

#### AVALIAÇÃO DE CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR CONFORME LOCALIZAÇÃO DA LESÃO

			LOCAL		Total
			CD	CE	
concordancia_P1.2_P2	Discordancia	Count	8 <sub>a</sub>	1 <sub>b</sub>	9
		% within LOCAL	12,5%	1,9%	7,7%
	Concordancia	Count	56 <sub>a</sub>	52 <sub>b</sub>	108
		% within LOCAL	87,5%	98,1%	92,3%
Total		Count	64	53	117
		% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%

CD: clon direito. CE: clon esquerdo.

Each subscript letter denotes a subset of LOCAL categories whose column proportions do not differ significantly from each other at the ,05 level.

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,599 <sup>a</sup>	1	,032		
Continuity Correction <sup>b</sup>	3,226	1	,072		
Likelihood Ratio	5,310	1	,021		
Fisher's Exact Test				,039	,032
N of Valid Cases	117				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,08.

b. Computed only for a 2x2 table

## APÊNDICE 4

### AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR ENTRE OS PATOLOGISTAS COM E SEM ÊNFASE EM GASTROENTEROLOGIA

		P3		Total	
		PH	PSS		
P1.3	PH	Count	53	0	53
		% of Total	49,1%	0,0%	49,1%
	PSS	Count	25	30	55
		% of Total	23,1%	27,8%	50,9%
Total		Count	78	30	108
		% of Total	72,2%	27,8%	100,0%

P1.3: patologistas com ênfase em gastroenterologia; P3: patologista sem ênfase em gastroenterologia

#### Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error <sup>a</sup>	Approx. T <sup>b</sup>	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,541	,072	6,327	,000
N of Valid Cases		108			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

## APÊNDICE 5

## PREVALÊNCIA DE GÊNERO

		DIAGNÓSTICO		Total	
		PH	PSS		
GÊNERO	F	Count	32 <sub>a</sub>	36 <sub>a</sub>	68
		% within P11	61,5%	65,5%	63,6%
	M	Count	20 <sub>a</sub>	19 <sub>a</sub>	39
		% within P11	38,5%	34,5%	36,4%
Total		Count	52	55	107
		% within P11	100,0%	100,0%	100,0%

Each subscript letter denotes a subset of P11 categories whose column proportions do not differ significantly from each other at the ,05 level.

Chi-Square Tests<sup>c</sup>

	Value	Df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,177 <sup>a</sup>	1	,674	,693	,413
Continuity Correction <sup>b</sup>	,048	1	,826		
Likelihood Ratio	,177	1	,674	,693	,413
Fisher's Exact Test				,693	,413
N of Valid Cases	107				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 18,95.

b. Computed only for a 2x2 table

c. For 2x2 crosstabulation, exact results are provided instead of Monte Carlo results.

## APÊNDICE 6

## PREVALÊNCIA DO GÊNERO CONFORME A LATERALIDADE DA LESÃO

P2			LOCAL		Total
			CD	CE	
PH	F	Count	20 <sub>a</sub>	12 <sub>a</sub>	32
		% within LOCAL	74,1%	48,0%	61,5%
	M	Count	7 <sub>a</sub>	13 <sub>a</sub>	20
		% within LOCAL	25,9%	52,0%	38,5%
	Total	Count	27	25	52
		% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%
PSS	F	Count	21 <sub>a</sub>	15 <sub>a</sub>	36
		% within LOCAL	72,4%	57,7%	65,5%
	M	Count	8 <sub>a</sub>	11 <sub>a</sub>	19
		% within LOCAL	27,6%	42,3%	34,5%
	Total	Count	29	26	55
		% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%

CD: clon direito. CE: clon esquerdo.

Each subscript letter denotes a subset of LOCAL categories whose column proportions do not differ significantly from each other at the ,05 level.

Chi-Square Tests<sup>c</sup>

P2	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)	
PH	Pearson Chi-Square	3,729 <sup>a</sup>	1	,053	,087	,050
	Continuity Correction <sup>b</sup>	2,708	1	,100		
	Likelihood Ratio	3,772	1	,052	,087	,050
	Fisher's Exact Test				,087	,050
	N of Valid Cases	52				
PSS	Pearson Chi-Square	1,314 <sup>d</sup>	1	,252	,273	,194
	Continuity Correction <sup>b</sup>	,744	1	,389		
	Likelihood Ratio	1,317	1	,251	,273	,194
	Fisher's Exact Test				,273	,194
	N of Valid Cases	55				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 9,62.

b. Computed only for a 2x2 table

c. For 2x2 crosstabulation, exact results are provided instead of Monte Carlo results.

d. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,98.

## APÊNDICE 7

## MÉDIA DE IDADE CONFORME A LATERALIDADE DA LESÃO

P2	LOCAL	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
PH	CE	26	56,62	5,177	1,015
	CD	27	54,56	12,296	2,366
PSS	CE	26	59,73	7,131	1,398
	CD	29	58,83	10,624	1,973

PH:pólipo hiperplásico. PSS: pólipo séssil serrilhado. CD: cólon direito. CE: cólon esquerdo.

## Independent Samples Test

P2	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
PH IDADE	Equal variances assumed	20,425	,000	,789	51	,434	2,060	2,610	-3,179	7,299
	Equal variances not assumed			,800	35,215	,429	2,060	2,575	-3,166	7,286
PSS IDADE	Equal variances assumed	1,554	,218	,366	53	,716	,903	2,470	-4,050	5,857
	Equal variances not assumed			,374	49,275	,710	,903	2,418	-3,956	5,762



## APÊNDICE 8

## DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DOS PÓLIPOS HIPERPLÁSICOS

			MVHP	MPHP	GCHP	TOTAL
LOCAL	CD	Count	26	0	1	27
		% within P1	54,2%	0,0%	25,0%	50,9%
	CE	Count	22	1	3	26
		% within P1	45,8%	100,0%	75,0%	49,1%
Total	Count	48	1	4	53	
	% within P1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

CD: cólon direito. CE: cólon esquerdo. MVHP: pólio hiperplásico do tipo microvesicular. MPHP: pólio hiperplásico do tipo pobre em mucina. GCHP: pólio hiperplásico do tipo rico em células caliciformes.

## APÊNDICE 9

## LOCALIZAÇÃO ESPECÍFICA DAS LESÕES SERRILHADAS

		DIAGNÓSTICO				Total	
		MVHP	MPHP	GCHP	PSS		
LOC	AE	Count	1	0	0	0	1
		% within P1	2,4%	0,0%	0,0%	0,0%	1,0%
	AH	Count	4	0	0	3	7
		% within P1	9,5%	0,0%	0,0%	5,9%	7,2%
	ASC	Count	14	0	1	16	31
		% within P1	33,3%	0,0%	33,3%	31,4%	32,0%
	CECO	Count	6	0	0	3	9
		% within P1	14,3%	0,0%	0,0%	5,9%	9,3%
	DESC	Count	5	0	2	10	17
		% within P1	11,9%	0,0%	66,7%	19,6%	17,5%
	RETOS	Count	2	0	0	0	2
		% within P1	4,8%	0,0%	0,0%	0,0%	2,1%
	SIG	Count	10	1	0	13	24
		% within P1	23,8%	100,0%	0,0%	25,5%	24,7%
	TRANS	Count	0	0	0	6	6
		% within P1	0,0%	0,0%	0,0%	11,8%	6,2%
	Total	Count	42	1	3	51	97
		% within P1	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

AE: ângulo esplênico. AH: ângulo hepático. ASC: ascendente. DESC: descendente. RETOS: transição retossigmóide. SIG: sigmoide. TRANS: transversal. MVHP: pólipo hiperplásico do tipo microvesicular. MPHP: pólipo hiperplásico do tipo pobre em mucina. GCHP: pólipo hiperplásico do tipo rico em células caliciformes.

**APÊNDICE 10****MÉDIA DE IDADE DOS PACIENTES QUANTO AOS SUBTIPOS DOS PH**

P1	Mean	N	Std. Deviation	Minimum	Maximum
MVHP	56,25	48	9,575	28	74
MPHP	50,00	1	.	50	50
GCHP	48,75	4	6,021	41	54

**MVHP: pólio hiperplásico do tipo microvesicular. MPHP: pólio hiperplásico do tipo pobre em mucina. GCHP: pólio hiperplásico do tipo rico em células caliciformes.**

## APÊNDICE 11

## PREVALÊNCIA DO GÊNERO NOS SUBTIPOS DOS PH

P1			LOCAL		Total	
			CD	CE		
MVHP	F	Count	20 <sub>a</sub>	12 <sub>a</sub>	32	
		% within LOCAL	76,9%	57,1%	68,1%	
	M	Count	6 <sub>a</sub>	9 <sub>a</sub>	15	
		% within LOCAL	23,1%	42,9%	31,9%	
	Total	Count	26	21	47	
		% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%	
MPHP	GÊNERO M	Count		1	1	
		% within LOCAL		100,0%	100,0%	
	Total	Count		1	1	
		% within LOCAL		100,0%	100,0%	
	GCHP	GÊNERO M	Count	1 <sub>a</sub>	3 <sub>a</sub>	4
			% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%
Total		Count	1	3	4	
		% within LOCAL	100,0%	100,0%	100,0%	

CD: cólon direito. CE: cólon esquerdo. MVHP: pólipo hiperplásico do tipo microvesicular. MPHP: pólipo hiperplásico do tipo pobre em mucina. GCHP: pólipo hiperplásico do tipo rico em células calciformes.

Chi-Square Tests<sup>c</sup>

P1		Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
MVHP	Pearson Chi-Square	2,092 <sup>a</sup>	1	,148	,211	,129
	Continuity Correction <sup>b</sup>	1,280	1	,258		
	Likelihood Ratio	2,093	1	,148	,211	,129
	Fisher's Exact Test				,211	,129
	N of Valid Cases	47				
MPHP	Pearson Chi-Square	. <sup>d</sup>				
	N of Valid Cases	1				
GCHP	Pearson Chi-Square	. <sup>e</sup>				
	N of Valid Cases	4				
PSS	Pearson Chi-Square	1,314 <sup>f</sup>	1	,252	,273	,194
	Continuity Correction <sup>b</sup>	,744	1	,389		
	Likelihood Ratio	1,317	1	,251	,273	,194
	Fisher's Exact Test				,273	,194
	N of Valid Cases	55				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,70.

b. Computed only for a 2x2 table

c. For 2x2 crosstabulation, exact results are provided instead of Monte Carlo results.

d. No statistics are computed because SEXO and LOCAL are constants.

e. No statistics are computed because SEXO is a constant.

f. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8,98.